

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide hind bakterile *Pseudomonas putida*

Bakalaureusetöö

12 EAP

Krista Rooni

Juhendajad PhD Rita Hõrak

MSc Sirli Rosendahl

TARTU 2019

INFOLEHT

Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide hind bakterile *Pseudomonas putida*

Arvatakse, et kromosomaalsed toksiin-antitoksiin (TA) süsteemid on bakteritele olulised erinevate keskkonna-stressidega toimetulekuks. Aktiivseid valke kodeerivate genoomsete TA süsteemide rohkus viitab, et kromosomaalsed TA süsteemid peaksid bakterile kasulikud olema, samas pole tihti operoni deleteerimisel bakterile mingit negatiivset mõju täheldatud. Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli testida hüpoteesi, et kromosomaalsed TA süsteemid on bakterile *P. putida* kulukad. Samuti selgitasin mõningate *P. putida* toksiinide toksilisuse määra konkurentsikatses. Tulemused näitasid: (1) toksiin-antitoksiin süsteemid ei ole bakterile otseselt vajalikud, kuid pole talle ka koormaks. Kuna toksiin-antitoksiin süsteemid ei ole bakterile kulukad võib järeldada, et ka valikusurve nende süsteemide genoomist eemaldamiseks on nõrk; (2) *P. putida* toksiinid MazF, RelE ja HicA-1 on inaktiivsed; (3) *P. putida* toksiin MqsR on aktiivne.

Märksõnad: toksiin-antitoksiin süsteem, *Pseudomonas putida*, konkurentsivõime

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The Cost of Chromosomal Toxin-Antitoxin Systems to *Pseudomonas putida*

It is commonly believed that bacteria need toxin-antitoxin (TA) systems in order to cope with different environmental stresses. Although the abundance of functional protein coding chromosomal TA systems in bacterial genomes indicates that chromosomal TA systems should be advantageous for the bacteria, the deletion of the TA operon often has no negative effects on the bacteria. The aim of this research was to test the hypothesis that chromosomal TA systems are costly for *Pseudomonas putida*. In addition, the range of the toxic effects of some of the toxins of *Pseudomonas putida* was tested. The results revealed: (1) although the TA systems seem not to be essential for the bacteria, they are not costly either and therefore it can be concluded that the selective pressure to delete these systems from bacterial chromosomes is low; (2) the *P. putida* toxins MazF, RelE and HicA-1 are inactive; (3) the *P. putida* toxin MqsR is active.

Keywords: toxin-antitoxin system, *Pseudomonas putida*, competitiveness

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT.....	3
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS	7
I. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Toksiin-antitoksiin süsteemid (TA süsteemid)	8
1.2. Tüüp II TA süsteemid	12
1.3. <i>Pseudomonas putida</i> TA süsteemid.....	14
1.3.1. GraTA süsteem	15
1.3.2. MazEF süsteem	17
1.3.3. MqsRA süsteem.....	17
1.3.4. RES-Xre süsteem.....	18
1.4. TA süsteemide funktsioonid	19
1.4.1. Genoomse mobiilse DNA stabiliseerimine	20
1.4.2. Kaitse faagide eest	20
1.4.3. Stressitaluvuse moduleerimine	21
1.5. Kromosomaalsete TA lookuste deleteerimise efektid	23
II. EKSPERIMENTAALNE OSA	25
2.1. Töö eesmärgid.....	25
2.2. Materjal ja meetodika	26
2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid.....	26
2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	27
2.2.3. Gelelektroforees.....	28
2.2.4. Bakterite elektroporatsioon.....	29
2.2.5. Bakterite märgistamine resistentsusgeeniga.....	29
2.2.6. Sekveneerimine	29
2.2.7. Konkurentsikatsed	30
2.2.8. Statistiline andmetöötlus	31
2.3. Tulemused.....	32
2.3.1. 13 TA süsteemi puudumine ei mõjuta oluliselt <i>P. putida</i> konkurentsivõimet ei rikkas söötmes ega ka antibiootikumistressi tingimustes.....	32
2.3.2. <i>P. putida</i> operonide PP0770-0771 (<i>mazEF</i>), PP1480-1479 (<i>hicAB-1</i>) ja PP1268-1267 (<i>relBE</i>) kodeeritavad toksiinid on inaktiivsed.....	36
2.4. Arutelu	39
2.4.1. Kromosomaalsete TA süsteemide kulukus bakterile <i>P. putida</i>	39
2.4.2. <i>P. putida</i> TA süsteemide kodeeritavate toksiinide funktsionaalsus	41

KOKKUVÕTE	43
SUMMARY	44
TÄNUSÕNAD	46
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	47
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	55
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	56

KASUTATUD LÜHENDID

ART - ADP-ribosüül transferaas

Bp - bensüülpenitsilliin

CFU - kolooniat moodustav ühik (ingl. k. *colony-forming unit*)

Cipro - tsiprofloksatsiin

Km - kanamütsiin

LB - lüsogeenne sööde (ingl. k. *lysogeny broth*)

NQO - 4-nitrokinoliin N-oksiid

Para - parakvaat

PPX - eksopolüfosfataas

Sm - streptomütsiin

SISSEJUHATUS

Toksiin-antitoksiin süsteemid (TA süsteemid) on bakterites laialdaselt levinud kaheosalised geneetilised elemendid, mis kodeerivad rakule kahjulikku toksiini ja vastavat toksiini neutraliseerivat antitoksiini. Tavaolukorras on toksiin antitoksiini poolt vaigistatud, kuid kui antitoksiini tase langeb, hakkab vabanenud toksiin inhibeerima rakule olulisi protsesse, mille tulemusena bakterite kasv aeglustub või inhibeeritakse täielikult. Seejuures varieerub erinevate toksiinide toksilisuse määr suuresti.

Algselt avastati TA süsteemid plasmiididest, kus nende funktsiooniks on bakteris plasmiidide säilitamine, mis tagatakse antitoksiini ja toksiini erineva stabiilsusega. Plasmiidita rakkudes lagundatakse TA kompleksis olev labiilne antitoksiin ja vabanev toksiin inhibeerib raku kasvu, viies plasmiidita rakkude populatsioonist väljakonkureerimiseni.

Bakterite genoomides leidub hulgaliselt ka kromosomaalseid TA süsteeme, mida valdavalt seostatakse bakterite vastupanuvõime tõstmisega erinevatele keskkonnastressidele. Samas on kromosomaalsete süsteemide funktsioonides siiski palju ebaselgust. Ühelt poolt lubab TA süsteemide rohkus bakterite genoomis ja tõik, et suur osa neist süsteemidest kodeerib aktiivseid valke arvata, et TA süsteemid peavad bakteritele kuidagi kasulikud olema. Teisalt näitavad mitmed tulemused, et TA süsteeme võib bakteri genoomist eemaldada ilma eriliste efektideta bakteri kohasusele. See tõstatab küsimuse kromosomaalsete TA süsteemide hinnast bakterile – potentsiaalselt on TA süsteemid bakteritele toksilised, mistõttu võiks eeldada, et TA geenid on bakterile kulukad ja seega tugeva valikusurve all. Sellest tulenevalt võib omakorda spekuloida, et TA süsteemidele rakenduv valik võib olla põhjuseks, miks mitmed kromosomaalsed TA lookused kodeerivad toksiine, mille toksilisus on madal või puudub sootuks (Ramage *et al.*, 2009; Tamman *et al.*, 2014).

P. putida TA süsteemide uuringud on näidanud, et valdav osa neist süsteemidest on funktsionaalsed ja kodeerivad aktiivset toksiini (Ainelo *et al.*, 2016; Luup, 2017; Tamman *et al.*, 2014; Rosendahl, publitseerimata). Samas ei mõjuta 13-ne TA süsteemi puudumine *P. putida* kohasust ja stressitaluvust (Luup, 2017), mis viitab, et bakteril ei ole neist TA süsteemidest justkui kasu.

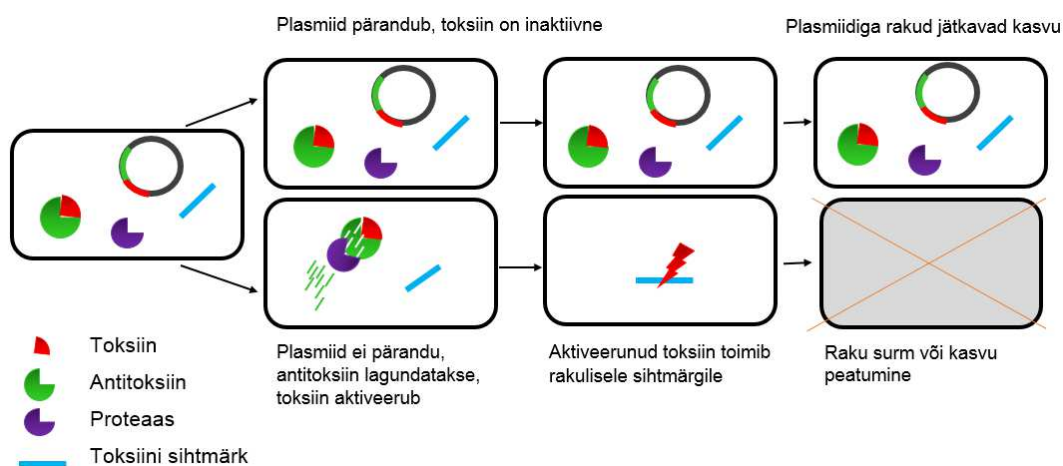
Selgitamaks, kas kromosomaalsetel TA süsteemidel võiks olla *P. putida* jaoks ka teatav hind, seadsime käesoleva uurimistöö eesmärkideks testida hüpoteesi, et kromosomaalsed TA süsteemid on bakterile *P. putida* kulukad, samuti analüüsida nelja *P. putida* toksiini toksilisuse määra konkurentsikatses.

I. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Toksiin-antitoksiin süsteemid (TA süsteemid)

TA süsteemid on kaheosalised geneetilised elemendid, mis koosnevad stabiilsest rakule kahjulikust toksiinist ja vastavat toksiini neutraliseerivast labiilsest antitoksiinist. Üldjuhul ekspresseeritakse toksiin ja talle vastav antitoksiin samalt operonilt (Yamaguchi *et al.*, 2011).

Toksiin-antitoksiin süsteemide geenid avastati 1980ndatel plasmiididest, kui leiti, et nad on olulised plasmiidide säilitamiseks rakus (Joonis 1) (Gerdes *et al.*, 1986^a; Ogura ja Hiraga, 1983). TA süsteemi kodeerivat plasmidi kandvad bakterid on elujõulised, kuna TA operonilt kodeeritud antitoksiin moodustab toksiiniga stabiilse kompleksi ja neutraliseerib toksiini kahjuliku mõju. Tütarrakud, mis ei päri plasmidi, saavad emarakult koos tsütoplasma siiski kaasa TA kompleksid. Kuna antitoksiin on labiilsem kui toksiin, lagundatakse antitoksiin raku proteaaside poolt. Vabanenud toksiini ei ole enam võimalik vaigistada, kuna TA geenide puudumise tõttu ei saa antitoksiini juurde toota. Seega saab toksiin toimida oma rakulisele sihtmärkmolekulile ja toksiini toimet ilma plasmiidita tütarrakud kas hukkuvad või peetub nende kasv (Gerdes *et al.*, 1986^a; Gerdes *et al.*, 1986^b). Kasvueelise saavad TA süsteemi kodeeriva plasmiidiga rakud ja ilma plasmiidita rakud konkureeritakse populatsioonist välja (Cooper ja Heinemann, 2000).



Joonis 1. TA süsteemi olemasolust sõltuv plasmidisäilitusmehhanism. Plasmidi sisaldavates bakterites ekspresseeritakse nii toksiini kui antitoksiini. Antitoksiin neutraliseerib toksiini mõju. Plasmiidita rakkudes antitoksiini ega toksiini juurde ei toodeta. Emakult pärandunud TA kompleksides olev antitoksiin lagundatakse ja toksiin aktiveerub. Toksiini mõjul rakkude kasv peatub või rakud surevad. Plasmiidita bakterid konkureeritakse populatsioonist välja.

Tuleb mainida, et hiljutised tulemused on kahtluse alla seadnud pikka aega levinud arvamuse, et lisaks rakkude kasvu inhibeerimisele, põhjustavad plasmiidid süsteemid ka raku surma (mehhanism, mida ingliskeelses kirjanduses teatakse termini PSK ehk *post-segregational*

killing all). PSK toimimist mainiti esmalt Gerdes *et al.* (1986^a) poolt. Samas on toksiini surmavat efekti näidatud vaid toksiini ületootmise korral ja mitte toksiini füsioloogiliste tasemete juures (Song ja Wood, 2018).

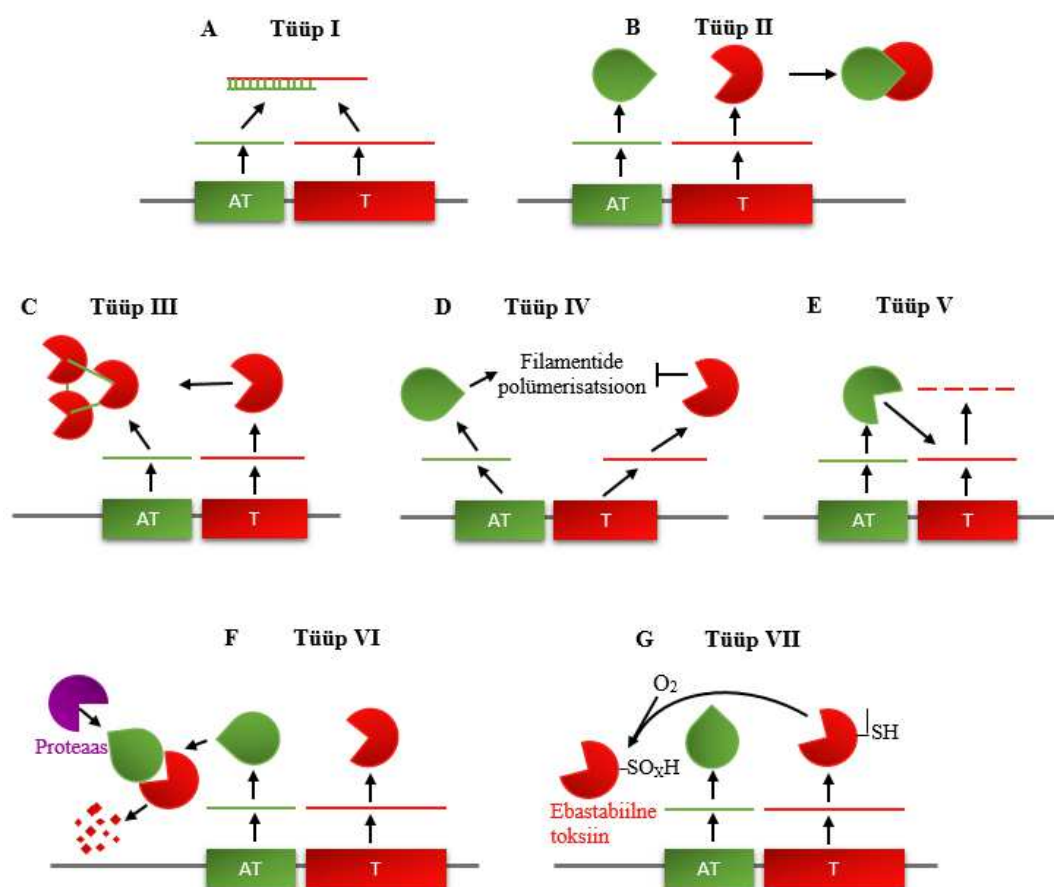
Plasmiidsete TA süsteemide kõrval on hiljem leitud arvukalt TA süsteeme ka bakterite kromosoomides ja genoomsetes mobiilsetes elementides (Díaz-Orejas *et al.*, 2017). Kuigi kromosomaalsed TA süsteemid on bakterites laialdaselt levinud, varieerub TA lookuste arv ja tüüp erinevates bakteriliikides tugevalt: nii on stressirohketes tingimustes (näiteks vabalt elavatel) bakteritel TA süsteeme rohkem kui soodsamate elutingimustega (näiteks rakusisestel) bakteritel (Harms *et al.*, 2018; Pandey ja Gerdes, 2005). Näiteks on vabalt elaval bakteril *Mycobacterium tuberculosis* ennustatud sadakond genoomset TA süsteemi (Akarsu *et al.*, 2019; Ramage *et al.*, 2009; Sala *et al.*, 2014), samas kui obligatoorsel rakusisesel bakteril *Mycobacterium leprae* on ennustatud vaid ühe TA süsteemi olemasolu (Leplae *et al.*, 2011). Bakter võib korraga omada ka mitmeid erinevat tüüpi TA süsteeme. Näiteks on bakteril *Bacillus subtilis* leitud vähemalt neli tüüp I ja kaheksa tüüp II TA süsteemi (Brantl ja Müller, 2019).

TA süsteemide kodeeritavad toksiinid on alati valgud. Valdav osa toksiinidest on ensüümid, mis ühel või teisel moel inhibeerivad translatsiooni või DNA replikatsiooni, kuid on ka toksiine, mis kahjustavad membraani või takistavad rakuseina sünteesi (Harms *et al.*, 2018; Mutschler *et al.*, 2011). Translatsiooni takistamine on eelnimetatud mehhanismidest levinuim (Masuda ja Inouye, 2017) ja selleks on väga erinevaid mooduseid nagu näiteks mRNA (aga ka tRNA, rRNA ja tmRNA) lagundamine (Amitai *et al.*, 2009; Masuda ja Inouye, 2017; Wang ja Wood, 2011), elongatsioonifaktori EF-Tu fosforüleerimine, mis blokeerib EF-Tu seondumise aminoatsüül-tRNA-dega (Castro-Roa *et al.*, 2013; Schumacher *et al.*, 2009), tRNA atsetüleerimine (Cheverton *et al.*, 2016; Jurėnas *et al.*, 2017^a) või ribosoomi biogeneesi inhibeerimine (Ainelo *et al.*, 2016). Arvatakse, et translatsioon võib olla toksiinide evolutsiooniliselt eelistatud sihtmärk, kuna translatsiooni inhibeerimine pole raku elutegevusele nii drastilise mõjuga kui näiteks replikatsiooni takistamine või rakuseina kahjustamine ning seega on TA süsteemi juhuslikul aktiveerumisel toksiini tekitatud kahjusid lihtsam likvideerida (Guglielmini ja Van Melder, 2011).

Antitoksiinid on valgud või väikesed mittekodeerivad RNAd, mis hoiavad toksiini oma kontrolli all kas otsese interaktsiooni kaudu toksiiniga või kaudselt TA kompleksi ekspressiooni transkriptsioonilise või translatsioonilise regulatsiooni abil (Harms *et al.*, 2018). Tavaolukorras on toksiin antitoksiini poolt vaigistatud. Et toksiini toime saaks avalduda, peab esmalt antitoksiin lagunema. Antitoksiinid ongi üldjuhul toksiinidest ebastabiilsemad ja on

näidatud, et nende stabiilsus väheneb veelgi stressitingimustes (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013). Arvatakse, et toksiini aktiveerumine on bakterile kasulik stressirohkete tingimuste üleelamiseks, sest toksiini toime väheneb bakterite kasvukiirus või lähevad rakud metaboolselt inaktiivsesse seisundisse (Harms *et al.*, 2018), kus nad on stressitingimustele vähem tundlikud (Tuomanen *et al.*, 1986). Valguliste antitoksiinide suhteline ebastabiilsus võrreldes toksiinidega tuleneb nende ehituslikust omapärasest, sest tihti on antitoksiinid lõpuni voltumata. Antitoksiini struktureerimata osa on vajalik toksiiniga seondumiseks (Loris ja Garcia-Pino, 2014; Page ja Peti, 2016), ent see põhjustab ka antitoksiini kiiret lagundamist, kuna voltumata valgu osa on substraadiks raku proteaasidele, mis stressitingimustes on raku ülesreguleeritud (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013).

Hetkel teadaolevad TA süsteemid jagatakse seitsmesse klassi vastavalt mehhanismile, kuidas antitoksiin neutraliseerib toksiini toime (Joonis 2) (Page ja Peti, 2016; Song ja Wood, 2018). Tüüp I ja tüüp III antitoksiinid on väikesed mittekodeerivad RNAd, kõigil teistel juhtudel on antitoksiin valguline (Page ja Peti, 2016; Song ja Wood, 2018). Toksiin on kõigil juhtudel valk (Marimon *et al.*, 2016; Page ja Peti, 2016).



Joonis 2. Antitoksiinide poolt toksiinide vaigistamiseks kasutatavad mehhanismid. Antitoksiinide geenid, mRNA-d ja valgud on joonisel toodud roheliselt. Toksiinide geenid, mRNA-d ja valgud on joonisel toodud punaselt (Ainelo, 2018, kohandatud).

Tüüp I antitoksiinid on valdavalt väikesed mittekodeerivad RNAd, mis blokeerivad toksiini kodeeriva mRNA-ga paardudes selle translatsiooni (Joonis 2A) (Brantl, 2012). Tavatingimustel takistab selline paardumine ribosoomi seondumist ja moodustunud RNA dupleksi lagundavad raku RNAasid. Kui antitoksiiniga seondumist ei toimu (näiteks kui stressitingimustes on antitoksiini kogus rakus vähenenud), siis transleeritakse toksiini kodeerivalt mRNA-lt valk, milleks on enamasti väike hüdrofoobne rakumembraaniga seonduv ja seda kahjustav toksiin (Page ja Peti, 2016). Tüüp I süsteemide hulka kuuluvad näiteks *E. coli* Hok/Sok ja SymE/SymR süsteemid (Fozo *et al.*, 2008).

Tüüp II antitoksiinid on valgud, mis moodustavad valgulise toksiiniga kompleksi, kus toksiin on mitteaktiivne (Joonis 2B) (Harms *et al.*, 2018). Valdav osa tüüp II toksiinidest on mRNA-d lagundavad endonukleasid (Syed ja Lévesque, 2012). Tüüp II süsteemide hulka kuuluvad näiteks *E. coli* MazEF ja RelBE süsteemid (Pedersen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003).

Tüüp III antitoksiiniks on väike mittekodeeriv RNA, mis seondub valgulise antitoksiiniga, moodustades pseudosõlmstruktuure (Joonis 2C). Tüüp III süsteem on taimepatogeeni *Pectobacterium atrosepticum* ToxIN süsteem (Blower *et al.*, 2012).

Tüüp IV antitoksiinid ei seonu toksiiniga, vaid stabiliseerivad hoopis toksiini sihtmärkmolekule (Joonis 2D). Antitoksiini puudumisel on toksiini destabiliseeriva mõju tõttu rakkude jagunemine häiritud (Page ja Peti, 2016). Tüüp IV TA süsteemi näitena võib tuua *E. coli* YeeU/YeeV süsteemi. Toksiini YeeV sihtmärgiks on raku tsütoskeleti valgud MreB ja FtsZ, mille polümerisatsioon on toksiini toimel häiritud. Antitoksiin YeeU (ehk CbeA, ingl. k. *cytoskeleton bundling-enhancing factor A*) interakteerub aga tsütoskeleti valkudega, stabiliseerides MreB ja FtsZ filamente ja neutraliseerides sellega toksiini mõju (Masuda *et al.*, 2012).

Tüüp V antitoksiin on endonukleas, mis lagundab toksiini kodeeriva mRNA, inhibeerides nii toksiini sünteesi (Joonis 2E) (Wang *et al.*, 2012). Stressitingimustel lagundatakse tüüp V GhoS antitoksiini kodeeriv mRNA tüüp II süsteemi toksiini MqsR poolt, mis võimaldab ekspresseerida rakumembraani kahjustavat tüüp V GhoT toksiini. Sel moel toimiv *E. coli* GhoT/GhoS süsteem on seni ainuke teadaolev tüüp V TA süsteem (Wang *et al.*, 2013).

Tüüp VI TA süsteemi ainsaks esindajaks on hetkel bakteri *Caulobacter crescentus* SocB/SocA süsteem (Joonis 2F). Tüüp VI antitoksiin SocA on adaptorvalk, mis SocB toksiiniga seondudes soodustab selle lagundamist ClpXP proteaasi poolt. Kui toksiini ei lagundata, takistab toksiin DNA replikatsiooni toimumist (Aakre *et al.*, 2013).

Tüüp VII TA süsteemide esindajaks on *E. coli* hapniku-tundlik süsteem Hha/TomB (Joonis 2G). Tüüp VII antitoksiin TomB inhibeerib Hha toksiini molekulaarse hapniku juuresolekul – antitoksiin soodustab toksiini tsüsteiini jäägi oksüdeerumist, mis vähendab toksiini stabiilsust ja seega ka selle toksilisust (Marimon *et al.*, 2016).

Lisaks klassikalistele kaheosalistele TA süsteemidele leidub ka kolme- ja üheosalisi süsteeme. Esimesel juhul on kolmandaks osapooleks valk (näiteks tüüp II perekonda kuuluv kolmeosaline ω - ϵ - ζ süsteem) (Dufour *et al.*, 2018; Hallez *et al.*, 2010; Unterholzner *et al.*, 2013; Zielenkiewicz ja Ceglowski, 2005), teisel juhul on tüüp II toksiin ja antitoksiin ühe ja sama polüpeptiidi osad (näiteks tüüp II laadne TA süsteem EzeT *E. coli*'s) (Rocker ja Meinhardt, 2015).

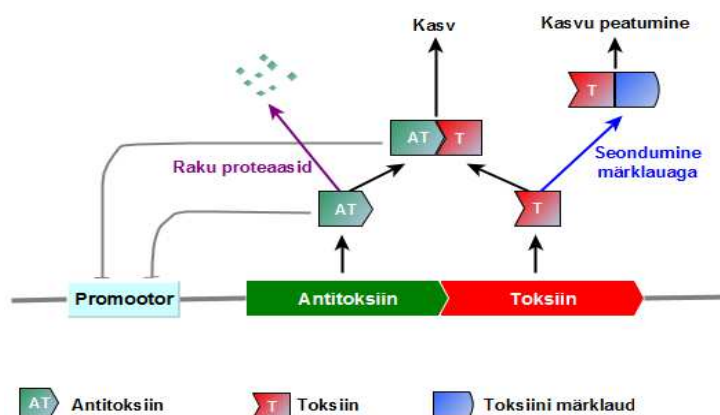
1.2. Tüüp II TA süsteemid

Tüüp II süsteemid on bakterites enim levinud ja ka enim uuritud TA süsteemid (Díaz-Orejas *et al.*, 2017; Page ja Peti, 2016; Sberro *et al.*, 2013). Need süsteemid kodeerivad valgulist stabiilse iseloomuga toksiini ja samuti valgulist, kuid üldjuhul ebastabiilset antitoksiini, mis moodustab toksiiniga tugeva kompleksi ning blokeerib toksiini toime (Yamaguchi *et al.*, 2011). Tüüpiliselt kodeeritakse tüüp II TA süsteemide toksiin ja antitoksiin samalt operonilt (Yamaguchi ja Inouye, 2009).

Tüüp II TA süsteeme reguleeritakse nii transkriptsiooniliselt, translatsiooniliselt kui post-translatsiooniliselt. Tüüp II antitoksiinid on DNA-ga seonduvad valgud ja toimivad TA operoni transkriptsioonil enamasti negatiivse autoregulaatorina (Page ja Peti, 2016). Toksiini aktiivsust reguleeritakse aga post-translatsiooniliselt, moduleerides antitoksiini stabiilsust (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013; Tamman, 2016).

Enamasti eelneb antitoksiini geen TA operonis toksiini geenile (Joonis 3) (Pandey ja Gerdes, 2005). Arvatakse, et selline paigutus soosib antitoksiini sünteesi – antitoksiin transkribeeritakse ja transleeritakse enne kui algab toksiini süntees, mis tagab rakus piisava antitoksiini hulga toksiini kontrolli all hoidmiseks (Chan *et al.*, 2016). Samas on leitud ka tüüp II süsteeme, kus geenide järjekord operonis on vastupidine (HigBA, GraTA, MqsRA süsteemid) (Gerdes *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2017; Tamman *et al.*, 2014). Neil juhtudel tagatakse toksiini kontrolli all hoidmiseks piisava antitoksiini koguse tootmine kas antitoksiini geeni ees oleva lisapromootoriga (Tian *et al.*, 1996) või mRNA ebavõrdse transleerimisega. Näiteks GraTA süsteemis transleeritakse antitoksiini mRNAd oluliselt efektiivsemalt kui toksiini-spetsiifilist mRNAd (Tamman, 2016). Viimase aja uuringud viitavad, et antitoksiini

üle hulk rakus tagataksegi enamasti antitoksiini efektiivsema translatsiooniga (Deter *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2014).



Joonis 3. Üldine tüüp II TA süsteemide toimemehhanism. Antitoksiin ja toksiin kodeeritakse samalt operonilt. Antitoksiin moodustab toksiiniga stabiilse kompleksi, mis vaigistab toksiini ja seondub promootorile, represseerides TA moodulit. Sõltuvalt konkreetsest TA süsteemist seondub promootorile kas antitoksiin üksinda või antitoksiin-toksiini kompleks. Antitoksiin lagundatakse raku proteaaside poolt stressitingimustes, võimaldades toksiinil seonduda oma rakulise sihtmärgiga. Toksiini seondumine sihtmärgiga viib raku kasvu peatumiseni ja/või raku surmani (Yamaguchi ja Inouye, 2011, kohandatud).

Tüüp II TA süsteemide antitoksiinid koosnevad tavaliselt kahest domeenist: N-terminaalne DNA-ga seonduv domeen on oluline TA operoni autoregulatsiooniks, C-terminaalne domeen aga seondub toksiiniga ja inaktiveerib selle (Harms *et al.*, 2018; Page ja Peti, 2016). TA operoni transkriptsiooni võivad tüüp II süsteemide puhul negatiivselt reguleerida nii toksiin-antitoksiin kompleks kui ka antitoksiin üksinda (Joonis 3). Osade TA süsteemide regulatsioonis on antitoksiin üksinda nõrgem repressor kui TA kompleks (Yamaguchi *et al.*, 2011). Sellisel juhul toimub TA promootori represseerimine nn tingimusliku kooperatiivsuse (ingl. k. *conditional cooperativity*) põhimõttel, kus see, kas operonile seonduvas TA kompleksis olev toksiin toimib ko- või derepressorina sõltub antitoksiini ja toksiini vahekorra rakus (Afif *et al.*, 2001; Overgaard *et al.*, 2008). Nii toimub näiteks *E. coli relBE* operoni regulatsioon: kui antitoksiin on rakus ülehulgas, toimib TA kompleks transkriptsioonilise repressorina, kui aga ülehulgas on toksiin, toimib toksiin derepressorina (Overgaard *et al.*, 2008). Tingimuslik kooperatiivsus on tüüp II TA süsteemide puhul tavaline, kuid mitte ainus operoni transkriptsiooniline regulatsioonimehhanism. Näiteks represseerib *E. coli mqsRA* operoni transkriptsiooni vaid antitoksiin MqsA, samas kui toksiin MqsR toimib derepressorina, sest TA kompleks DNA-ga ei seonu (Brown *et al.*, 2013). Tingimusliku kooperatiivsusega ei ole reguleeritud ka *E. coli* YafQ/DinJ, *Proteus vulgaris*'e HigB/HigA ega *P. putida* GraTA TA süsteemide ekspressioon (Ruangprasert *et al.*, 2014; Schureck *et al.*,

2014; Talavera *et al.*, 2019).

Tüüp II TA süsteemide toksiinide aktiivsuse post-translatsiooniline regulatsioon toimib antitoksiini stabiilsuse kaudu. Üldjuhul on antitoksiin ebastabiilsem kui toksiin, mistõttu tuleb toksiooni vaigistamiseks antitoksiini pidevalt juurde toota (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013). Stressitingimustes lagundavad antitoksiini raku proteaasid ja selle tulemusena aktiveeritakse TA süsteem (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013; Christensen *et al.*, 2004). Antitoksiini stabiilsuse osas on erandlik *E. coli* MqsA, mis tavatingimustes on väga stabiilne, kuid mille stabiilsus langeb drastiliselt oksüdatiivse stressi ajal – oksüdatiivse stressi tingimustes oli Wang *et al.* (2011) katsetes MqsA poolestusaeg vaid 1,25 minutit, samas kui normaaltingimustes oli see *ca* 60 minutit.

Tüüp II toksiinid on enamasti RNAasid, mis inhibeerivad translatsiooni RNA lagundamise kaudu (Skjærning *et al.*, 2019). Nii näiteks lõikavad tüüp II süsteemide toksiinidest mRNA-d MqsR ja RelE, kusjuures MqsR puhul on tegemist ribosoom-sõltumatu, RelE puhul aga ribosoom-sõltuva lõikamisega (Pedersen *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2009). MazF perekonna erinevad toksiinid lõikavad nii mRNA-d, rRNA-d kui ka tRNA-d – näiteks lõikavad bakteri *Mycobacterium tuberculosis* toksiin MazF-mt6 rRNA-d (Schifano *et al.*, 2013), toksiinid MazF-mt3 ja MazF-mt7 mRNA-d (Zhu *et al.*, 2008), toksiin MazF-mt9 aga tRNA-d (Schifano *et al.*, 2016). *M. tuberculosis*'e toksiin HigB lõikab tmRNA-d (Schuessler *et al.*, 2013).

Lisaks RNA lagundamisele võivad tüüp II TA süsteemid translatsiooni takistada ka translatsioonifaktorite modifitseerimise, translatsiooni initsiatsiooni või ribosoomide biogeneesi inhibeerimise teel (Ainelo *et al.*, 2016; Jurėnas *et al.*, 2017^a; Jurėnas *et al.*, 2017^b).

Tüüp II TA toksiinid võivad inhibeerida ka replikatsiooni või rakuseina sünteesi. Näiteks blokeerib toksiin FicT DNA güraasi ja topoisomeraasi IV tööd. FicT adenüleerib nii DNA güraasi kui topoisomeraasi IV, blokeerides sellega nende ATPaasse aktiivsuse ja inaktiveerides seega mõlemad sihtmärkmolekulid, mille tulemusena on takistatud normaalne replikatsioon (Harms *et al.*, 2015). *Streptococcus pneumoniae* PezT toksiooni toime on aga inhibeeritud rakuseina süntees (Mutschler *et al.*, 2011).

1.3. *Pseudomonas putida* TA süsteemid

Pseudomonas putida on Gram-negatiivne bakter, keda looduses võib tavapärastelt leida mulla- või veekeskkonnast. *P. putida* tüvel KT2440, mis on isogeenne meie laboris uuritava tüvega PaW85, on ennustatud kuni 15 TA süsteemi. Kõik *P. putida*'l ennustatud TA süsteemid

kuuluvad tüüp II süsteemide hulka (Xie *et al.*, 2018). Neist 15-st on lähemalt uuritud vaid nelja TA süsteemi: GraTA (Ainelo *et al.*, 2019, 2016; Talavera *et al.*, 2019; Tamman *et al.*, 2014, 2016), MazEF (Miyamoto *et al.*, 2016), MqsRA (Sun *et al.*, 2017) ning RES-Xre (Skjærning *et al.*, 2019).

1.3.1. GraTA süsteem

Lookuse PP1586-PP1585 kodeeritud ja pseudomonaadidel konserveerunud GraTA (ingl. k. *growth rate affecting Toxin-Antitoxin*) süsteem oli esimene *P. putida*'l tuvastatud TA süsteem, mis on nime saanud toksiooni võimest mõjutada rakkude kasvukiirust (Tamman *et al.*, 2014). Süsteem kuulub HigBA perekonda, millega tal on kõige suurem sarnasus nii valgujärjestuse kui operoni ehituse osas (Ainelo *et al.*, 2016). Erinevalt enamikust tüüp II TA süsteemide operonidest, milles antitoksiini geen eelneb toksiooni geenile, on *graTA* operonis toksiooni kodeeriv *graT* geen antitoksiini kodeerivast *graA* geenist eespool (Tamman *et al.*, 2014).

Antitoksiin GraA on *graTA* operoni autorepressor – GraA seondub *graTA* promootoralale, takistades ilmselt RNA polümeraasi seondumist ning seega ka *graTA* operoni transkriptsiooni (Tamman *et al.*, 2014). GraA seondumine promootorile on kooperatiivne, sest operaatorile seondub üheaegselt kaks GraA dimeeri (Talavera *et al.*, 2019). Erinevalt paljude teiste TA süsteemide toksiinidest ei toimi toksiin GraT korepressorina, vaid derepressorina, takistades GraA seondumist *graTA* promootorile (Talavera *et al.*, 2019).

GraA on väga efektiivne antitoksiin, kuna ta suudab neutraliseerida GraT toime isegi toksiooni üleekspressiooni korral (Tamman *et al.*, 2014). GraA on teiste antitoksiinidega võrrelduna ka ebatavaliselt stabiilne – kui enamike antitoksiinide poolestusaeg jääb vahemikku ~15-20 minutit (Goeders ja Van Melder, 2014), siis GraA puhul võivad poolestusajad erinevate tingimuste juures ulatuda ühest tunnist kuni enam kui nelja tunnini (Tamman *et al.*, 2016). GraA on kõige ebastabiilsem üleminekul eksponentsiaalsest kasvufaasist statsionaarsesse, samas kui eksponentsiaalses ja statsionaarses kasvufaasis on GraA väga stabiilne. Hüpotetiliselt võiks GraA vähenenud stabiilsus faasidevahelisel üleminekul aidata bakteril kohaneda muutunud keskkonnatingimusega (Tamman *et al.*, 2016). Erinevalt paljudest teistest TA süsteemide antitoksiinidest, mis lagundatakse ATP-sõltuvate Lon ja ClpP proteaasidega (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013), ei mõjuta Lon ja ClpP GraA stabiilsust. Diskreetse laguprodukti tekkimine viitab, et GraA lagundamine initsieeritakse endoproteolüütiliselt hetkel veel tundmatu proteaasi poolt (Tamman *et al.*, 2016).

GraT toksiinil on näidatud mitmesuguseid efekte bakteri füsioloogiale, muuhulgas mõjutab GraT bakteri kasvukiirust ja stressitaluvust (Tamman *et al.*, 2014), ribosoomide biogeneesi (Ainelo *et al.*, 2019, 2016) ning rakumembraanide permeaablust (Tamman *et al.*, 2014). Katsed antitoksiini deletsioonmutandiga ($\Delta graA$) on näidanud, et GraT on mõõduka toimega toksiin, sest esiteks on antitoksiini kodeerivat geeni võimalik genoomist eemaldada ja teiseks ilmneb $\Delta graA$ tüvel optimaalsetel kasvutingimustel (30°C) vaid vähene kasvukiiruse langus (Tamman *et al.*, 2014). Seejuures on huvitav, et toksiooni põhjustatud bakterite kasvu pärssiv efekt sõltub temperatuurist, olles tugevam madalatel temperatuuridel (temperatuuril 20°C oli $\Delta graA$ mutandi kasvukiirus LB vedelsöötmes üle viie korra aeglasem kui metsiktüvel ja LB agarsöötmele ei suutnud $\Delta graA$ tüvi sel temperatuuril kolooniaid moodustada). Kõrgematel temperatuuridel (37°C) seevastu GraT bakterite kasvu ei pärssinud (Tamman *et al.*, 2014).

GraT suurendab rakumembraani permeaablust ja on vastandliku mõjuga bakteri stressitaluvusele (Tamman *et al.*, 2014). Näiteks talub $\Delta graA$ oluliselt paremini translatsiooni inhibiitoritena toimivaid streptomütsiini ja kanamütsiini, samuti replikatsiooni inhibiitoreid mitomütsiini C ja tsiprofloksatsiini. Samas on $\Delta graA$ mutant tundlikum H_2O_2 , NaCl, parakvaadi ja tetratsükliini suhtes. Seega tõstab GraT bakterite vastupanuvõimet mõningatele stressoritele, kuid langetab tolerantsust teistele stressoritele (Tamman *et al.*, 2014).

Teadupärast on üheks TA süsteemide toksiinide toimemehhanismiks translatsiooni takistamine. Paljud toksiinid toimivad seejuures RNAasidena ja ka GraT on ribosoom-sõltuv mRNAas (Talavera *et al.*, 2019). Lisaks inhibeerib GraT ka ribosoomide biogeneesi, põhjustades ebaküpsete ribosoomi subühikute kuhjumist (Ainelo *et al.*, 2019, 2016). GraT põhjustatud ribosoomi biosünteesi häire põhjus ei ole selge, küll aga näitas Ainelo *et al.* (2019) poolt läbiviidud täisproteoomi analüüs, et GraT mõju all kasvanud rakkudes on tõusnud ribosoomi biogeneesi abifaktorite hulk, mis ilmselt aitab GraT toksilist mõju vähendada.

Eripärane on ka GraTA süsteemi valkude struktuur, sest kui tavaliselt on antitoksiinid osaliselt struktureerimata valgud (Loris ja Garcia-Pino, 2014; Page ja Peti, 2016), siis GraA on täieliku struktuuriga (Talavera *et al.*, 2019). Viimane võib seletada ka antitoksiini suurt stabiilsust. Samas on hoopis GraT osaliselt struktureerimata. Voltumata osa toksiooni N-terminuses on oluline nii *graTA* operoni regulatsioonil kui ka toksiooni funktsionaalsuses. Nimelt takistab GraT N-terminus steeriliselt GraA seondumist operoni promootorile ja oletatavalt reguleerib toksiooni seondumist ribosoomiga (Talavera *et al.*, 2019).

1.3.2. MazEF süsteem

MazEF süsteemi kodeerib *P. putida* lookus PP0771-PP0770 (Miyamoto *et al.*, 2016). MazEF süsteemi on põhjalikult uuritud *E. coli*'l, kus süsteem kodeerib RNAasse aktiivsusega toksiini MazF ja antitoksiini MazE. *E. coli* MazF on järjestusspetsiifiline ribosoom-sõltumatu endoribonukleaas, mis tunneb ära ja lõikab mRNA-s ACA järjestust (Zhang *et al.*, 2003). Ka *P. putida* MazF toksiin on ribosoom-sõltumatu mRNAas, ent *P. putida* MazF tunneb ära ja lõikab mRNA-s UAC järjestust, tehes löike U ja A nukleotiidide vahelt (Miyamoto *et al.*, 2016).

E. coli'l inhibeerib MazF valgusünteesi, kuid mitte DNA replikatsiooni ega RNA sünteesi (Mets *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2003). *P. putida* puhul ei ole MazEF süsteemi täpne toimemehhanism ja mõjud rakule teada. Seni ainsas *P. putida* MazEF süsteemi käsitlenud artiklis (Miyamoto *et al.*, 2016) on tehtud katseid puhastatud MazF valguga *in vitro*. Samas meie laboris, sh käesoleva uurimustöö raames läbi viidud *in vivo* katsed näitavad, et *P. putida* kromosomaalsest lookusest MazF toksiini kas ei ekspresseerita või on MazF valk inaktiivne.

1.3.3. MqsRA süsteem

E. coli MqsRA süsteem kodeerib toksiini MqsR (ingl. k. *motility quorum sensing regulator*) ja antitoksiini MqsA. MqsR tuvastati esmalt kui bakteri liikuvuse ja biofilmi regulaator (González Barrios *et al.*, 2006). *P. putida* genoomis kodeerib MqsRA süsteemi lookus PP4205-PP4204, mis omab *E. coli* MqsRA süsteemiga ~50% identsust (Sun *et al.*, 2017).

P. putida MqsRA süsteemi kohta on seni ilmunud üks artikkel (Sun *et al.*, 2017). Sarnaselt *graTA* operonile paikneb ka *mqsRA* operonis toksiini geen enne antitoksiini geeni. Ka *P. putida* *mqsRA* operoni regulatsioon sarnaneb *graTA*'le, sest promootori autorepressioon sõltub vaid antitoksiinist ja toksiin toimib derepressorina. Kui toksiini ja antitoksiini suhe on toksiini kasuks, siis takistab MqsR antitoksiini seondumist DNA-le (Sun *et al.*, 2017).

MqsRA toksiin-antitoksiin süsteemi on seostatud antibiootikumitolerantsete persistorrakkude tekke ja biofilmi moodustamisega mitmetel bakteritel nagu näiteks bakteril *E. coli* (González Barrios *et al.*, 2006; Wang ja Wood, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2009) ja taimepatogeeni *Xylella fastidiosa* (Merfa *et al.*, 2016). Sarnaselt *E. coli* MqsRA-le, on ka *P. putida* MqsRA süsteem seotud nii persistorite kui biofilmi moodustamisega (Sun *et al.*, 2017). *P. putida* *mqsRA* geenide puudumisel biofilm vähenes, aga ebatavaline oli see, et biofilmi defekt oli ühesugune nii ainult toksiini, ainult antitoksiini, kui ka terve TA süsteemi deleteerimisel. Teisalt oli antitoksiini ja ka TA süsteemi üleekspresseerimisel biofilmile positiivne mõju (Sun *et al.*,

2017). See erineb *E. coli* MqsRA süsteemist, kus *mqsR* geeni deletsioon suurendas (Kim *et al.*, 2010), kuid *mqsRA* operoni deleteerimine vähendas (Kasari *et al.*, 2010) biofilmi tootmist.

P. putida MqsRA süsteem mõjutab ka persistorite moodustumist. Katsetes *mqsRA* deletsioonmutantidega, täheldati antitoksiini puudumisel tsiprofloksatsiini suhtes tolerantsete persistorite arvukuse 53-kordset tõusu, samas kui toksiini kodeeriva geeni või terve TA süsteemi eemaldamine ei avaldanud persistorite tekkele olulist mõju (Sun *et al.*, 2017).

E. coli mqsR ja ka kogu *mqsRA* operoni deleteerimisel ei ole enamasti täheldatud mingit mõju bakterite kasvukiirusele (González Barrios *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2015). Samas soodustab MqsRA süsteemi olemasolu *E. coli* tolerantust sapphapetele (Kwan *et al.*, 2015). *P. putida* kasvukiirusele toksiini, antitoksiini ega ka terve MqsRA süsteemi deleteerimine märgatavat mõju ei avaldanud (Sun *et al.*, 2017). Ka meie laboris tehtud katsed näitavad, et genoomsest *mqsRA* lookusest antitoksiini geeni eemaldamine on võimalik, kuid see siiski pärssib bakterite kasvukiirust ja mõjutab stressitolerantsust (Luup, 2017).

Kui *X. fastidiosa* ja *E. coli* MqsR üleproduktsoon põhjustab muutuseid ka rakumorfoloogias (pikenenud rakud) (Kasari *et al.*, 2010; Merfa *et al.*, 2016; Yamaguchi *et al.*, 2009), siis *P. putida* puhul sarnast efekti ei täheldatud (Sun *et al.*, 2017).

1.3.4. RES-Xre süsteem

P. putida lookus PP2434–PP2433 kodeerib uut tüüpi TA süsteemi RES-Xre, mille toksiin lagundab NAD⁺i (Skjærning *et al.*, 2019). RES-Xre süsteem koosneb RES domeeni sisaldavast toksiinist ja Xre domeeni sisaldavast antitoksiinist. Lookuse ülesehitus vastab enimlevinud tüüp II TA süsteemile, kus antitoksiini kodeeriv geen (*xre*) eelneb toksiini kodeerivale geenile (*res*) (Skjærning *et al.*, 2019).

RES domeen on oma nimetuse saanud kodeeritava valgu järjestuses leiduva kolme konserveerunud aminohappe, arginiini (R), glutamiinhappe (E) ja seriini (S) järgi, mis on olulised toksiini aktiivsuses (Makarova *et al.*, 2009; Skjærning *et al.*, 2019). Lisaks on RES toksiinil konserveerunud ka 33. positsiooni türosiin (Y), mis arvatakse olevat oluline toksiini interakteerumiseks antitoksiiniga, kuid ilmselt pole see oluline toksiini katalüütiliseks aktiivsuseks (Skjærning *et al.*, 2019). Antitoksiini kodeeriv geen on samuti konserveerunud ja sellelt toodetav valk sisaldab Xre perekonnale iseloomulikku DNA-d siduvat heeliks-pööre-heeliks motiivi (Makarova *et al.*, 2009).

RES toksiin on struktuurilt sarnane ADP-ribosüül transferaasidega (ART), mis toimivad sihtmärkmolekulide post-translatsioonilise modifitseerimise kaudu, katalüüsides ADP-riboosi

üleviimist NAD⁺ doonormolekulilt substraadile (valgud, DNA või RNA) (Freire *et al.*, 2019). Samasse ensüümide gruppi kuulub ka näiteks difteeria toksiin. Erinevalt ART-dest on aga RES toksiinil ka NAD⁺ siduv tasku, mis viitab RES toksiini funktsionaalsele erinevusele võrreldes ART-dega. Xre antitoksiin blokeerib NAD⁺ seondumise toksiini RES motiiviga, sest toksiin-antitoksiin kompleksis on antitoksiini C-terminus seondunud NAD⁺ siduvasse taskusse (Skjærning *et al.*, 2019).

Arvatakse, et *P. putida* RES toksiini mõju rakkudele on pigem staatiline kui letaalne (Skjærning *et al.*, 2019). Toksiini toimega kaasnev rakusisese NAD⁺ taseme langus viib rakkude kasvu ja üldise makromolekulide biosünteesi inhibeerimiseni. NAD⁺ taseme langus mõjub inhibeerivalt nii transkriptsioonile, replikatsioonile kui ka translatsioonile. RES toksiini aktiveerimisel pärsitud raku DNA, RNA ja valgusünteesi võime on tõenäoliselt kaudselt põhjustatud NAD⁺ taseme langusest, kuid RES toksiini toime täpne molekulaarne mehhanism ei ole hetkel veel selge (Skjærning *et al.*, 2019).

P. putida RES-Xre süsteemi on seni iseloomustatud vaid ühes artiklis (Skjærning *et al.*, 2019), seejuures ei ole katsetes kasutatud kromosomaalse lookuse deletsioone – kõik katsed on tehtud üleekspresseeritud ja/või puhastatud valkudega ning lisaks on toksiini toksilisuse tagamiseks tehtud muudatusi nii *P. putida res* geeni stardikoodonis kui ka Shine Dalgarno järjestuses. Meie grupi andmed viitavad, et tegelikult kodeerib see TA süsteem ilmselt väheaktiivset toksiini, sest *xre* geeni (PP_2433) eemaldamine *P. putida* genoomist ei mõjuta bakteri kasvu toitainerikkas söötmes (LB), küll aga talub antitoksiini geenita bakter metsiktüvest kehvemini nitrokinoliini, streptomütsiini ja kanamütsiini stressi (Luup, 2017). Analoogne süsteem on leitud ka patogeenil *M. tuberculosis* (Freire *et al.*, 2019). Tegu on RES-Xre tüüpi süsteemiga MbcT/MbcA, mille toksiin MbcT on NAD⁺ fosforülaas, mis katalüüsib NAD⁺ lagundamist nii *in vitro* kui *in vivo* ja üleekspresseeritud toksiin mõjub bakterile letaalselt (Freire *et al.*, 2019). Samas on oluline märkida, et sarnaselt paljudele teistele TA lookustele pole ka *mbcTA* operoni deleteerimisel *M. tuberculosis*'ele mingeid fenotüübilisi efekte ei tava- ega ka stressitingimustel (Freire *et al.*, 2019).

1.4. TA süsteemide funktsioonid

Plasmiidsetel TA süsteemidel on rakus plasmidi säilitav funktsioon, kus ilma plasmiidita rakud konkureeritakse toksiini põhjustatud kasvupeetuse tõttu populatsioonist välja (Joonis 1). Bakterites ja arhedes väga levinud (Leplae *et al.*, 2011; Pandey ja Gerdes, 2005) kromosomaalsetele TA süsteemidele on välja pakutud mitmeid erinevaid funktsioone, kuid

eksperimentaalsed tulemused toetavad kolme peamist bioloogilist funktsiooni – genoomse mobiilse DNA stabiliseerimine, kaitse faagide eest ning stressitaluvuse moduleerimine (sh osalus persistorrakkude moodustamisel ja antibiootikumitolerantsuse tekkel). Kõigil kolmel juhul, nii TA süsteemi kodeeriva mobiilse elemendi kaotuse korral, nakatumisel bakteriofaagiga või bakterite sattumisel mõne keskkonnastressi surve alla, on oluliseks teguriks toksiini aktiveerumisest tingitud kasvu pärssimine (Harms *et al.*, 2018; Song ja Wood, 2018).

1.4.1. Genoomse mobiilse DNA stabiliseerimine

TA süsteeme on leitud genoomsete mobiilsete elementide koosseisust, kus nad on, sarnaselt plasmiidsetele TA lookustele, olulised mobiilse DNA stabiliseerimiseks kromosoomis (Harms *et al.*, 2018). Näiteks püsib sel moel *Vibrio cholerae* genoomis integratiivne konjugatiivne element SXT, mis annab bakteritele resistentsuse mitmete antibiootikumide suhtes. SXT elemendi püsimist genoomis stabiliseerib MosAT (ingl. k. *maintenance of SXT Antitoxin and Toxin*) süsteem (Wozniak ja Waldor, 2009). TA süsteemide stabiliseerivat mõju on täheldatud ka superintegronide genoomis püsimisele (Szekeres *et al.*, 2007).

1.4.2. Kaitse faagide eest

Mõningad TA süsteemid kaitsevad peremeesrakku bakteriofaagide eest nn abortiivse infektsiooni mehhanismiga. Sel juhul aktiveerib faagiga nakatumine genoomse TA süsteemi, mis pärsib nakatunud rakkude kasvu ja takistab seega faagi paljunemist (Harms *et al.*, 2018). Faagivastases kaitses osalevad näiteks tüüp IV TA süsteem AbiEi/ii (Dy *et al.*, 2014) ja tüüp III TA süsteem ToxIN (Cook *et al.*, 2013; Fineran *et al.*, 2009). *E. coli* puhul on näidatud, et RnlAB süsteem kaitseb faagi T4 (Koga *et al.*, 2011) ja SanaTA süsteem faagi T7 infektsiooni vastu (Sberro *et al.*, 2013).

Bakteriofaagidel on välja arenenud ka meetmed peremehe TA süsteemide vastu võitlemiseks – nad takistavad kas TA süsteemi aktiveerumist või selle funktsioneerimist, hoides TA süsteemide toksiine inaktiivsena või kasutades spetsiaalseid proteaaside inhibiitoreid, mis takistavad valguliste antitoksiinide lagundamist (Harms *et al.*, 2018; Otsuka ja Yonesaki, 2012). Näiteks kodeerib faag T7 Lon proteaasi inhibiitorit, mis kaitseb teda *E. coli sanaTA* süsteemi eest. Nimelt vastutab *sanaTA* süsteemi antitoksiini lagundamise eest Lon proteaas (Sberro *et al.*, 2013), mistõttu jääb toksiin Lon proteaasi inhibeerimisel antitoksiini mõju alla ja ei saa takistada faagi paljunemist. Faag T4 kaitseb end bakteriaalsete

TA süsteemide faagivastase toime eest ADP-ribosüültransferaasi Alt abil, mis inhibeerib *E. coli mazEF* süsteemi toksiini MazF (Alawneh *et al.*, 2016) ja valguga Dmd abil, mis sarnaneb antitoksiinile ja kontrollib *E. coli* TA süsteemide toksiine RnlA ning LsoA (Otsuka ja Yonesaki, 2012).

1.4.3. Stressitaluvuse moduleerimine

TA süsteeme seostatakse ka rakkude stressitaluvuse moduleerimisega, kuna nad võivad reguleerida bakterite kasvu toitainete puuduse korral (Christensen *et al.*, 2001; Hayes ja Sauer, 2003), mõjutada persistorite teket (Keren *et al.*, 2004; Kim ja Wood, 2010; Ronneau ja Helaine, 2019) või biofilmi moodustumist (González Barrios *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011).

TA süsteemide seos poomis- ja SOS vastusega

Paljud TA süsteemid aktiveeritakse stressitingimustes. Osade TA moodulite regulatsiooni mõjutavad sellised üldised rakulised stressivastused nagu poomis- ja SOS vastus (Ronneau ja Helaine, 2019). Poomisvastus vallandatakse toitainete puudusel ja seda reguleerib alarmoon (p)ppGpp, mille kuhjumisel rakus programmeeritakse bakteri elutegevus ümber nii, et ta suudaks stressi toimele paremini vastu panna (Traxler *et al.*, 2008).

Poomisvastusest indutseeritud TA süsteemide ülesreguleerimist või aktiveerimist on täheldatud mitmetel juhtudel. Aminohapete näljast tingitud poomisvastust on võimalik esile kutsuda seriin-hüdroksamaadi lisamisel, mis seondub serüül-tRNA süntetaasiga ja takistab selle tööd ning ühtlasi kutsub esile (p)ppGpp kuhjumise rakus (Traxler *et al.*, 2008). Kui tekitada aminohapete (seriini) nälga seriin-hüdroksamaadi lisamisel *E. coli* kasvukeskkonda, põhjustab see (p)ppGpp kuhjumist rakus ja tüüp II TA mooduli HicAB ülesreguleerimist (Jørgensen *et al.*, 2009). Sarnane efekt on ka isoleutsiini nälja puhul, mille tulemusena reguleeritakse üles mitmed tüüp II TA moodulid, sh HicAB, MazEF, RelBE, MqsRA (Shan *et al.*, 2017). Eelnimetatud tüüp II moodulite ekspressioon suureneb ka vastusena osmootsele stressile (Shan *et al.*, 2017).

SOS vastuse vallandab DNA kahjustus, mis võib tuleneda mitmesugustest teguritest (UV kiirgus, oksüdatiivne stress, antibiootikumide mõju) (Baharoglu ja Mazel, 2014). SOS vastus on esmajärjekorras seotud DNA reparatsioonisüsteemide aktiveerimisega, kuid mõningatel juhtudel on täheldatud ka osade tüüp I (näiteks TisB/IstR-1) ja tüüp II (näiteks YafNO) TA moodulite SOS vastusest sõltuv aktiveerumine (Singletary *et al.*, 2009; Vogel *et al.*, 2004).

TA süsteemide osalus persistorite tekkes

Persistorid on väike hulk soikeseisundis olevaid rakke bakteripopulatsioonis – nad on metaboolselt inaktiivsed, mistõttu on nad tolerantssed antibiootikumidele ja teistele keskkonnast tulenevatele stressidele (Harms *et al.*, 2018). Pärast stressori (näiteks antibiootikumi) eemaldamist keskkonnast on nad võimelised populatsiooni taastama. Seetõttu seostatakse persistoreid krooniliste infektsioonide esinemisega (Cohen *et al.*, 2013).

Erinevates uuringutes on välja toodud ka TA süsteemide osalus persistorrakkude tekkes. Persistorite teket seostatakse toksiinide stressist sõltuva aktivatsiooniga ja rakkude üleminekuga stressitolerantsesse soikeseisundisse, mis aitab bakteritel toime tulla ebasobivate keskkonnatingimustega (Harms *et al.*, 2018; Ronneau ja Helaine, 2019). Peaasjalikult seostatakse persistorite tekkega tüüp I ja tüüp II TA süsteeme (Ronneau ja Helaine, 2019). Näiteks on märgatud tüüp II toksiinide RelE ja MazF positiivset mõju persistorite tekkele toksiinide üleekspressiooni korral: RelE ja MazF üleekspresseerimisel tõusis oluliselt rakkude hulk, mis jäid ellu pärast antibiootikumitöötlust. Seega võib RelE ja MazF antitoksiini puudumine viia persistorite tekkele (Keren *et al.*, 2004; Tripathi *et al.*, 2014). Mitmed uuringud on näidanud ka teise tüüp II TA süsteemi, MqsRA seotust persistorite tekkega. Tulemused on siiski vastuolulised, sest ühe uuringu kohaselt langeb MqsRA süsteemi deleteerimisel tunduvalt persistorite arv (Kim ja Wood, 2010), kuid samas teise uuringu järgi toksiooni MqsR geeni deleteerimine persistorite arvukust ei mõjuta (Shah *et al.*, 2006). Persistorite tekkega on seostatud ka tüüp I süsteemi TisB/IstR, kus katsed antitoksiini ja toksiooni deletsioonimutantidega on näidanud, et tsiprofloksatsiini stressi juures antitoksiini puudumisel persistorite hulk suureneb ning toksiooni puudumisel persistorite hulk väheneb (Dörr *et al.*, 2010).

TA süsteemide osalus biofilmi moodustumisel

Bakterite jaoks on üheks võimaluseks ebasoodsate keskkonnatingimustega toimetulekul biofilmi moodustamine. Biofilmi moodustamisega on seostatud mitmeid erinevaid TA süsteeme, mis mõjutavad biofilmi teket erineval moel.

Esimene TA süsteem, mida biofilmi reguleerimisega seostati, oli *E. coli* MqsRA, kuna leiti, et toksiin MqsR on biofilmi moodustavates rakkudes ülesreguleeritud (Ren *et al.*, 2004) ja on seotud biofilmi suurenenud tootmisega signaalmolekuli autoinduktor 2 kaudu (González Barrios *et al.*, 2006). Toksiini puudumisel biofilmi hulk vähenes (González Barrios *et al.*, 2006; Kasari *et al.*, 2010). Hiljem leiti, et biofilmi moodustumisele avaldab mõju antitoksiin MqsA, mis suudab lisaks oma promootori reguleerimisele mõjutada ka üldist stressivastust,

repressseerides statsionaarse faasi sigma faktori RpoS ekspressiooni (Wang *et al.*, 2011). Oksüdatiivne stress viib antitoksiini lagundamisele, mis omakorda aktiveerib sigma faktori RpoS sünteesi. RpoS tõstab tsüklilise di-GMP sünteesi taset, mis viib rakkude vähenenud liikuvuse ja suurenenud biofilmi tootmiseni (Wang *et al.*, 2011). MqsA suudab biofilmi teket mõjutada ka otse, seondudes *csgD* promootorile ja repressseerides seega käharate piilide ja tselluloosi tootmise regulaatorvalgu CsgD operoni. Selle tulemusena on biofilmi tootmine häiritud (Soo ja Wood, 2013).

Mõju piilide ekspressioonile ning biofilmi moodustamisele on näidatud ka *E. coli* MazEF, RelBE, YoeB/YefM, YafQ/DinJ ja ChpB süsteemide puhul (Kim *et al.*, 2009).

1.5.Kromosomaalsete TA lookuste deleteerimise efektid

On arutletud ka selle üle, kas kromosomaalsed TA süsteemid on bakteritele tegelikkuses üldse vajalikud, sest vaatamata sellele, et TA süsteemid kodeerivad funktsionaalseid toksine, pole enamasti terve TA operoni deletsioonil bakterile mingit efekti (Tamman *et al.*, 2014; Tsilibaris *et al.*, 2007; Unoson ja Wagner, 2008). Kuna TA süsteemide mõju on üldjuhul uuritud bakteritüvedega, millel on antitoksiini geen eemaldatud või kus toksini ekspresseeritakse üle, st vähem või rohkem artefaktsetel tingimustel, siis jääb kromosomaalsete TA süsteemide bioloogiline roll endiselt paljuski hüpoteetiliseks.

2011. aastal Maisonneuve *et al.* poolt läbi viidud uuring andis tugeva aluse oletuseks, et TA süsteemid on bakteritele olulised persistorite tekkes. Järeldused põhinesid *E. coli*'ga läbi viidud katsetel, kus konstrueeriti TA süsteemide deleteerimisel *E. coli* $\Delta 10TA$ mutant, millel oli tehtud deletsioone kümnes TA lookuses, sh RelEB, YefM/YoeB, HigBA, PrlF/YhaV, YafNO, DinJ/YafQ, MazF, ChpB, MqsRA ja HicAB. Leiti, et kümne TA süsteemi deleteerimine vähendas oluliselt persistorite hulka, kuid ei mõjutanud rakkude kasvukiirust. Ühtlasi leiti, et TA süsteemidel on kumulatiivne efekt, kuna persistorite arvukus vähenes seda enam mida rohkem TA süsteeme oli deleteeritud (Maisonneuve *et al.*, 2011). Sama uurimisgrupi poolt pakuti välja ka mudel, mis sidus (p)ppGpp taseme rakus persistorite tekkega – antud mudeli kohaselt inhibeerib (p)ppGpp kuhjumine rakus polüfosfaate lagundavat ensüümi eksopolüfosfataas (PPX). Polüfosfaatide akumulatsioon rakus aktiveerib Lon proteaasi, mis lagundab antitoksiine, võimaldades toksiinidel mõjule pääseda (Maisonneuve *et al.*, 2013).

Hiljem on mõlema Maisonneuve *et al.* poolt läbi viidud uuringu tulemused seatud tugeva kahtluse alla, kuna katsetes kasutatud bakterid olid saastunud profaagiga $\phi 80$ ning katsete kordamisel uuesti konstrueeritud $\Delta 10TA$ mutantidega seost kümne TA süsteemi deleteerimise

ja persistorite tekke vahel ei leitud (Goormaghtigh *et al.*, 2018; Harms *et al.*, 2017). Praeguseks on avaldatud tulemused autorite poolt ka tagasi võetud (Maisonneuve *et al.*, 2018^a; Maisonneuve, 2018^b). Sellele vaatamata ei saa täiesti välistada TA süsteemide osalust persistorite tekkes ega ka TA süsteemide kumulatiivset efekti, kuna leidub mõlemat hüpoteesi toetavaid uuringuid (Dörr *et al.*, 2010; Keren *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009; Tripathi *et al.*, 2014).

P. putida osas on laiapõhjalise uuringu läbi viinud S. Luup (2017), kes testis, kas *P. putida* genoomis kodeeritud TA süsteemid mõjutavad bakteri kohasust ja stressitaluvust. Selleks konstrueeriti *P. putida* metsiktüvest PaW85 deletsioontüvi $\Delta 13TA$, millest oli eemaldatud 13 tüüp II TA süsteemi operoni (lookused PP1586-1585 (*graTA*), PP2433-2434 (*res-xre*), PP1199-1198 (*higBA*), PP1480-1479 (*hicAB-1*), PP5435-0274 (*relE-higA*), PP4205-4204 (*mqsRA*), PP0770-0771 (*mazEF*), PP1716-1717, PP4530-4529 (*brnTA*), PP4151-4152, PP1268-1267 (*relBE*), PP2940-2939 (*yefM-yoeB*), PP2499-2500 (*relB-parE*)) ja võrreldi seejärel deletsioontüve kohasust ja stressitaluvust metsiktüvega (mh mõõdeti persistorite ja biofilmi teket, rakkude kasvukiirust ning stressitolerantsust erinevate kemikaalide ja UV kiirguse suhtes). Sama töö raames uuriti ka nende lookuste kodeeritavate toksiinide toksilisuse määra (Luup, 2017; Rosendahl, publitseerimata). Selleks konstrueeriti tüved, kust antitoksiin oli eemaldatud ja hinnati seejärel toksiinide toksilisust. Leiti, et viiel juhul oli toksiin tugevalt toksiline, sest antitoksiini geeni polnud võimalik genoomist deleteerida (*higBA*, *relE-higA*, PP4151-4152, *yefM-yoeB* ja *relB-parE*). Nelja TA süsteemi toksiin oli mõõdukalt toksiline, sest antitoksiin geeni deleteerimine kromosoomist oli küll võimalik, aga see pärssis osaliselt bakterite kasvu või mõjutas stressitaluvust (*graTA*, *res-xre*, *mqsRA* ja *brnTA*). Nelja lookuse puhul tundus toksiooni geen olevat inaktiivne, sest antitoksiini deleteerimisel ei tuvastatud mõju bakterite kohasusele ja stressitaluvusele (*hicAB-1*, *mazEF*, PP1716-1717 ja *relBE*). Vaatamata sellele, et valdav osa *P. putida* toksiinidest tunduvad olevat funktsionaalsed, siis 13-ne TA süsteemi puudumine *P. putida* kohasust ja stressitaluvust oluliselt ei mõjutanud (Luup, 2017). Seega jätavad eeltoodud tulemused jätkuvalt lahtiseks küsimuse kas üldse ja kui, siis milleks on bakteritel kromosomaalseid TA süsteeme vaja.

II. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Kromosomaalsetele TA süsteemidele on välja pakutud mitmeid funktsioone ning valdavalt seostatakse neid ühel või teisel moel bakteri stressitaluvuse tõstmisega. Samas on TA süsteemide mõju uuritud enamasti bakteritüvedega, millel on antitoksiini geen eemaldatud või kus toksiine ekspresseeritakse üle, jättes saadud tulemused mõneti artefaktseks.

P. putida TA süsteemide osas läbi viidud uuringud on näidanud, et valdav osa *P. putida* TA süsteeme on funktsionaalsed ja kodeerivad aktiivset toksiini (Ainelo *et al.*, 2016; Luup, 2017; Tamman *et al.*, 2014; Rosendahl, publitseerimata). Ometi ei mõjuta 13-ne TA süsteemi puudumine *P. putida* kohasust ja stressitaluvust (Luup, 2017), mis viitab, et bakteril ei ole neist TA süsteemidest kasu. Kuna aga potentsiaalselt on TA süsteemid bakteritele toksilised, on loogiline eeldada, et TA geenid on bakterile kulukad ja seega tugeva valikusurve all. Kuigi TA süsteemid võivad ebasoodsates tingimustes osutada bakteritele kasulikuks (vähendades bakteri kasvukiirust suurendavad nad stressitaluvust ja seega populatsiooni võimalust ellu jääda), tuleb bakteritel mõnedel juhtudel selle arvelt maksta ka teatavat hinda kehvema kasvu näol soodsates tingimustes (Stepanyan *et al.*, 2015). Võib spekuloida, et TA süsteemidele rakenduv valik võib olla põhjuseks, miks mitmed kromosomaalsed TA lookused kodeerivad toksiine, mille toksilisus on madal või puudub sootuks (Ramage *et al.*, 2009; Tamman *et al.*, 2014).

Eelnevalt Luup (2017) poolt läbi viidud uuringus kontrolliti hüpoteesi, et TA süsteemid on *P. putida*'le kasulikud, kuid vähemalt testitud tingimustel ei täheldatud, et TA süsteemidel oleks *P. putida*'le mingit positiivset efekti.

Käesoleva uurimistöö eesmärkideks oli:

- 1) testida hüpoteesi, et kromosomaalsed TA süsteemid on bakterile *P. putida* kulukad;
- 2) selgitada mõningate *P. putida* toksiinide toksilisuse määra.

Mõlemale küsimusele vastamiseks viidi läbi konkurentsikatsed, kus võrreldi deletsioonmutante metsiktüvega. Juhul kui TA süsteemide puudumisel bakterile üldse mingisugune mõju on, siis pikaajaline konkurentsikatse peaks olema piisavalt tundlik, et seda nähtavale tuua. Samuti eeldasime, et konkurentsikatse antitoksiini deletsioontüvedega võimaldab selgitada kas teatud toksiinid on inaktiivsed või vähemalt osaliselt aktiivsed.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Töös kasutatud bakteritüved on toodud Tabelis 1. Söötmena kasutati LB (*lysogeny broth*) söödet (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). Tardsöötme saamiseks lisati söötmesse agarit 15 g/l. Baktereid kasvatati temperatuuril 30°C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil. Tüvede seleksiooniks kasutati antibiootikume kanamütsiin (Km; 50 µg/ml), streptomütsiin (Sm; 200 µg/ml) ja bensüülpenitsilliin (Bp; 1,5 mg/ml).

Antibiootikumistressi tekitamiseks lisati LB vedelsöötmele kas bensüülpenitsilliini (Bp; 150 µg/ml), tsiprofloksatsiini (Cipro; 0,02 µg/ml), nitrokinoliini (NQO; 40 µM) või parakvaati (Para; 2 µg/ml).

Tabel 1. Töös kasutatud *P. putida* tüved ja plasmiidid

Bakteritüvi	Iseloomustus	Viide allikale
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85Tn7Km	PaW85 (metsiktüvi; isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega (Bayley <i>et al.</i> , 1977)), mille genoomi on viidud kanamütsiini resistentsusgeen	Sirli Rosendahl
PaW85Tn7Sm	PaW85 (Bayley <i>et al.</i> , 1977), mille genoomi on viidud streptomütsiini resistentsusgeen	Sirli Rosendahl
Δ13TA	PaW85 mitmikdeletsioonimutant, millest on eemaldatud 13 TA süsteemi	(Luup, 2017)
Δ13Tn7Km	Δ13TA, mille genoomi on viidud kanamütsiini resistentsusgeen	Sirli Rosendahl
Δ13Tn7Sm	Δ13TA, mille genoomi on viidud streptomütsiini resistentsusgeen	Sirli Rosendahl
Δmqsa	PaW85, millest on eemaldatud antitoksiini <i>mqsA</i> (PP4204) geen	Hedvig Tamman
ΔmazE	PaW85, millest on eemaldatud antitoksiini <i>mazE</i> (PP0770) geen	Hedvig Tamman
Δ1268 (ΔrelB)	PaW85, millest on eemaldatud antitoksiini <i>relB</i> (PP1268) geen	Rita Hõrak
Δ1479 (ΔhicB-1)	PaW85, millest on eemaldatud antitoksiini PP1479 geen	Rita Hõrak
Δmqsa_Tn7Km	Δmqsa, mille genoomi on viidud kanamütsiini resistentsusgeen	Käesolev töö
Δmqsa_Tn7Sm	Δmqsa, mille genoomi on viidud streptomütsiini resistentsusgeen	Käesolev töö

Δ amazE_Tn7Km	Δ amazE, mille genoomi on viidud kanamütsiini resistentsusgeen	Käesolev töö
Δ amazE_Tn7Sm	Δ amazE, mille genoomi on viidud streptomütsiini resistentsusgeen	Käesolev töö
Δ 1268(relB)_Tn7Km	Δ 1268(relB), mille genoomi on viidud kanamütsiini resistentsusgeen	Käesolev töö
Δ 1268(relB)_Tn7Sm	Δ 1268(relB), mille genoomi on viidud streptomütsiini resistentsusgeen	Käesolev töö
Δ 1479_Tn7Km	Δ 1479, mille genoomi on viidud kanamütsiini resistentsusgeen	Käesolev töö
Δ 1479_Tn7Sm	Δ 1479, mille genoomi on viidud streptomütsiini resistentsusgeen	Käesolev töö
Plasmiidid		
pBK-miniTn7- Ω Sm	miniTn7Sm transposooni sisaldav plasmiid	(Koch <i>et al.</i> , 2001)
pminiTn7-Km	miniTn7Km transposooni sisaldav plasmiid	Rita Hõrak
pUXBF13	Abiplasmiid, mis kodeerib Tn7 transpositsiooniks vajalikke valke (Amp ^r mob ⁺)	(Bao <i>et al.</i> , 1991)

2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i kasutasin miniTn7 transposooni insertiooni kontrollimiseks *glmS* lookusesse ja sekveneerimise tarbeks proovide ettevalmistamisel, et oleks võimalik kontrollida toksiini järjestuse terviklikkust.

PCR-i matriitsina kasutasin bakterirakke. Ühe reaktsiooni maht oli 20 μ l. Lisaks matriitsile sisaldas reaktsioonisegu: 1 x PCR-i puhvrit (7,5 mM Tris-HCl (pH 8,8)), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 ühikut Taq DNA polümeraasi ja mõlemat praimerit kontsentratsioonis 10 pmol. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud Tabelis 2.

PCR-i reaktsioon koosnes 25 tsüklist ja sisaldas järgnevaid etappe:

- 1) 96°C juures, 1 minut;
- 2) 56°C, 30 sekundit;
- 3) 72°C, sünteesiaeg sõltus amplifitseeritava ala pikkusest ja kasutatud polümeraasist arvestusega, et Taq polümeraas sünteesib 1000 nukleotiidi minutis.

Esimesele tsüklile eelnes 2-minutiline eelkuumutus 96°C juures rakkude lõhkumiseks ja pärast 25. tsükli järgnes pooleliolevate fragmentide lõpuni sünteesimiseks 2-minutiline lisasüntees temperatuuril 72°C.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

Nimetus	Nukleotiidne järjestus (5'→3')	Kus kasutati
Tn7GlmS	AATCTGGCCAAGTCGGTGAC	PCR antibiootikumi resistentsusgeeni kandva miniTn7 transposooni insertiooni kontrollimiseks.
Tn7R109	CAGCATAACTGGACTGATTTCAG	PCR antibiootikumi resistentsusgeeni kandva miniTn7 transposooni insertiooni kontrollimiseks.
769Hind	GCTAAGCTTGTACAAACTGGGTGTG	Tüvedes ΔmazE_Tn7Km ja ΔmazE_Tn7Sm toksiini geeni <i>mazF</i> sekveneerimiseks
772BHI	ACGGATCCTTGATGGAACGCACGAT	Tüvedes ΔmazE_Tn7Km ja ΔmazE_Tn7Sm toksiini geeni <i>mazF</i> sekveneerimiseks
1267Hind	TTAAAGCTTGCTGATGCATGCGTATTAG	Tüvedes Δ1268_Tn7Km ja Δ1268_Tn7Sm toksiini geeni PP_1267 sekveneerimiseks
1269Bam	AGGGATCCTCTGCCAAGGATTCCAA	Tüvedes Δ1268_Tn7Km ja Δ1268_Tn7Sm toksiini geeni PP_1267 sekveneerimiseks
1479Eco	GTGAATTTCGAGAATCGAATCCGCCT	Tüvedes Δ1479_Tn7Km ja Δ1479_Tn7Sm toksiini geeni PP_1480 sekveneerimiseks
1480Bam	AAGGATCCAACGACTCCAACACTACGG	Tüvedes Δ1479_Tn7Km ja Δ1479_Tn7Sm toksiini geeni PP_1480 sekveneerimiseks
4204Acc	TGGGTACCAGAACTGGTTCGGTGG	Tüvedes ΔmqsA_Tn7Km ja ΔmqsA_Tn7Sm toksiini geeni <i>mqsR</i> sekveneerimiseks
4205Sal	TCGTCTTCCTCAACATTGGC	Tüvedes ΔmqsA_Tn7Km ja ΔmqsA_Tn7Sm toksiini geeni <i>mqsR</i> sekveneerimiseks

2.2.3. Gelelektroforees

PCR-i produkte analüüsisin gelelektroforeesil. Selleks lisasin 5-20 µl-le PCR produktile 4 µl foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinine, 50% glütserool) ja kandsin proovid 1%-lisele etiidiumbromiidi (0,33 µg/ml) sisaldavale agarosgeelile 1 x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA pH 8,2). DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutasin firma *Thermo Scientific* markerit *DNA loading DYE*.

Elektroforees toimus pingel 135 V. DNA visualiseeriti UV valguses.

2.2.4. Bakterite elektroporatsioon

P. putida kompetentsete rakkude saamiseks kasvatati rakke ette üleöö (~ 20 h) 5 ml LB vedelsöötmes temperatuuril 30°C. Üleöö kultuurist tsentrifuugiti kokku 350 µl rakke (1 min, 15 000 rpm). Rakke pesti 1 ml 300 mM sahharoosiga kolm korda.

Rakkudele lisati DNA ja segu tõsteti elektroporatsiooniküveti. Rakud elektroporeeriti firma BIO RAD elektroporaatoriga *E. coli Pulser* pingel 2500 V ja pesti seejärel küvetist välja 1 ml LB vedelsöötmega. Rakke kasvatati 30°C loksutil kolm tundi. Pärast seda plaaditi rakud selektiivsöötmele.

2.2.5. Bakterite märgistamine resistentsusgeeniga

Märgistasin antitoksiini deletsioontüved kanamütsiini ja streptomütsiini resistentsusgeeniga. Kasutasin varasemalt Rita Hõraku ja Hedvig Tammani poolt konstrueeritud antitoksiini deletsioonmutante: $\Delta mqsA$, $\Delta mazE$, $\Delta 1268$ ja $\Delta 1479$ (Tabel 1). Iga antitoksiini deletsioontüve baasil konstrueerisin kaks antibiootikumiresistentsusega mutanti: üks kanamütsiini ja teine streptomütsiini resistentsusega. Töös konstrueeritud tüved on toodud Tabelis 1.

Kanamütsiini või streptomütsiini resistentsusgeen viidi bakteri *glmS* lookusesse, kasutades vastavat resistentsusgeeni kandvat Tn7 minitransposooni sisaldavat plasmidi ja abi-plasmidi (Tabel 1, Plasmiidid). Selleks lisati kompetentsetele rakkudele ~0,5 µg Tn7 minitransposooni sisaldavat plasmidi pBK-miniTn7-ΩSm või pminiTn7-Km ja ~0,5 µg abi-plasmidi pUXBF13, mis viidi rakkudesse elektroporatsiooni teel. Abi-plasmiid kodeerib valke, mis võimaldab minitransposoonil plasmiidist genoomi transponeeruda.

Pärast elektroporeerimist kasvatati rakke 30°C loksutil kolm tundi, et oleks aega ekspresseerida abi-plasmiidilt minitransposooni liikumiseks vajalikud valgud ja et minitransposoon jõuaks genoomi siseneda. Seejärel plaaditi rakud Km või Sm tassidele ja jäeti üleöö kasvama temperatuurile 30°C. Järgnevalt külvati miniTn7 transposooni sisaldavad mutandid paralleelselt bensüülpenitsilliini ja kanamütsiini või streptomütsiini tassidele ning valiti välja bensüülpenitsilliini suhtes tundlikud (plasmidi mittesisaldavad bakterid) ning streptomütsiini või kanamütsiini suhtes resistentsed kolooniad. MiniTn7 sisenemist *glmS* lookusesse kontrolliti PCR-ga ja toksiini geeni järjestuse terviklikkust sekveneerimisega.

2.2.6. Sekveneerimine

Sekveneeritavaid PCR produkte töödeldi PCR-ist kasutamata jäänud nukleotiidide ja praimerite eemaldamiseks firma *Thermo Scientific* eksonukleasiga (Exo I; 2,5 U/µl) ja aluselise fosfataasiga (SAP; 1 U/µl; *Thermo Scientific*) 30 minutit temperatuuril 37°C.

Seejärel inaktiveeriti ensüümid 15 minuti jooksul temperatuuril 80°C. Sekveneerimiseks valmistati proovid ette *Big Dye Terminator v3.1 CycleSequencing Kit*'iga (*Applied Biosystems*) kasutades tootjafirma modifitseeritud protokoll (J. Parik). Reaktsioonisegu lõppmaht oli 10 µl ja see sisaldas 1 µl eelnevalt töödeldud PCR produkti, 0,7 µl *Big Dye premix*'i, 2 µl 5 x lahjenduspuhvit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl₂), 2 pmol praimerit ja lõppmahuni deioniseeritud vett. Reaktsioon koosnes 30 tsüklist ja sisaldas järgmisi etappe:

- 1) 95°C, 15 sekundit;
- 2) 50°C, 10 sekundit;
- 3) 60°C, 45 sekundit.

Seejärel sadestati reaktsioonisegust DNA 2 µl dekstraani ja 30 µl 96% etanooliga 10 minuti jooksul temperatuuril -20°C. Sadet pesti kaks korda 150 µl 80% etanooliga ning võeti üles 10 µl-s 100%-lises formamiidis. Kasutati Eesti Biokeskuse tuumiklabori sekveneerimisteenust ja DNA sekveneeriti *Applied Biosystems* 3730x1 kapillaarsekvenaatoriga. Saadud nukleotiidseid järjestusi analüüsisin programmidega BioEdit 7.0.9.1 ja BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.2.7. Konkurentsikatsed

Konkurentsikatse tarbeks kasvatati 5 ml LB vedelsöötmes 30°C loksutil üleöö (~20 h) ette *P. putida* algse ja Δ13TA tüvede rakud. Ettekasvatatud rakukultuuride optiline tihedus mõõdeti lainepikkusel 580 nm ja tüved segati kokku OD₅₈₀ järgi suhtes 1:1. Saadud segakultuuriga inokuleeriti 5 ml LB vedelsöödet, lahjendades baktereid 10 000 korda. Segakultuure kasvatati 30°C loksutil. Tüvede konkurentsivõimekuse hindamiseks stressitingimustes kasvatati baktereid LB vedelsöötmes, millele oli lisatud erinevaid kemikaale: bensüülpenitsiliin (150 µg/ml), tsiprofloksatsiin (0,02 µg/ml), nitrokinoliin (40 µM), parakvaat (2 µg/ml). Kasutasin subinhibitoorseid antibiootikumide kontsentratsioone, mis olid eelnevalt selgeks tehtud katsetes *P. putida*'ga Sirli Rosendahli poolt.

Segakultuuridest tegin üle päeva 10 000-kordse lahjenduse värskesse 5 ml LB söötmesse. Iga nelja päeva järel määrasin LB+Km (50 µg/ml) ning LB+Sm (200 µg/ml) tassidel *P. putida* algse tüve ja deletsioontüve kolooniaid moodustavate ühikute arvu (CFU). Katse kestis 20-24 päeva.

2.2.8. Statistiline andmetöötlus

Selleks, et testida katses nähtud tüvede erinevuse statistilist olulisust üle kõigi ajapunktide (kas ühe tüve puhul on kolooniaid moodustavaid ühikuid keskmiselt üle kõigi ajapunktide rohkem, kui teise tüve puhul), viidi läbi kahefaktoriline dispersioonanalüüs. Tüvede erinevust CFU-de arvu osas konkreetsetes katsepunktides hinnati Wilcoxon'i astaksummatestiga.

Statistiline andmetöötlus viidi läbi tarkvarapaketiga R.

2.3. Tulemused

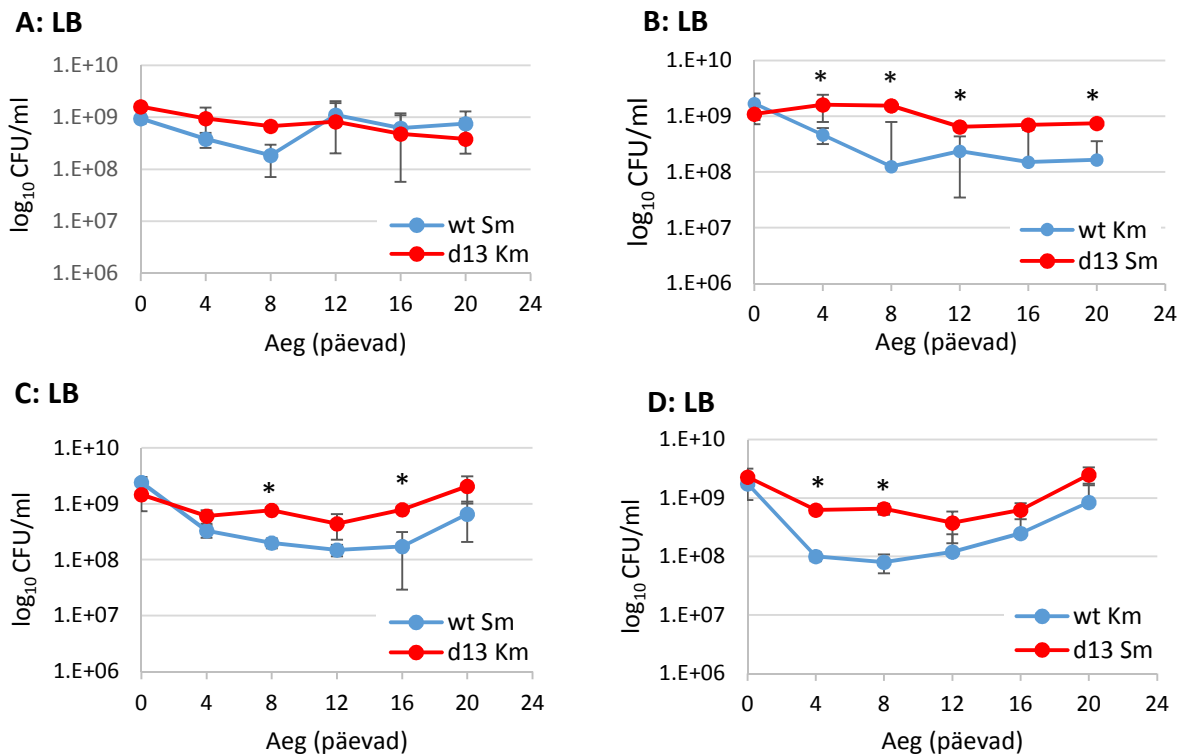
2.3.1. 13 TA süsteemi puudumine ei mõjuta oluliselt *P. putida* konkurentsivõimet ei rikkas söötmes ega ka antibiootikumistressi tingimustes

Kontrollimaks, kas TA süsteemid mõjutavad *P. putida* konkurentsivõimekust, kasvasin *P. putida* $\Delta 13TA$ mitmikdeletsioonmutanti ja metsiktüve 1:1 segakultuuris. Üks tüvi oli märgistatud kanamütsiini ja teine streptomütsiini resistentsusgeeniga. Selleks, et välistada resistentsusgeeni mõju tulemustele, olid tüved märgistatud mõlemat pidi ja alati oli katseseerias paralleelselt kaks segakultuuri, kus olid:

- streptomütsiini-resistentne metsiktüvi ja kanamütsiini-resistentne deletsioontüvi (wt Sm: $\Delta 13Km$);
- kanamütsiini-resistentne metsiktüvi ja streptomütsiini-resistentne deletsioontüvi (wt Km: $\Delta 13Sm$).

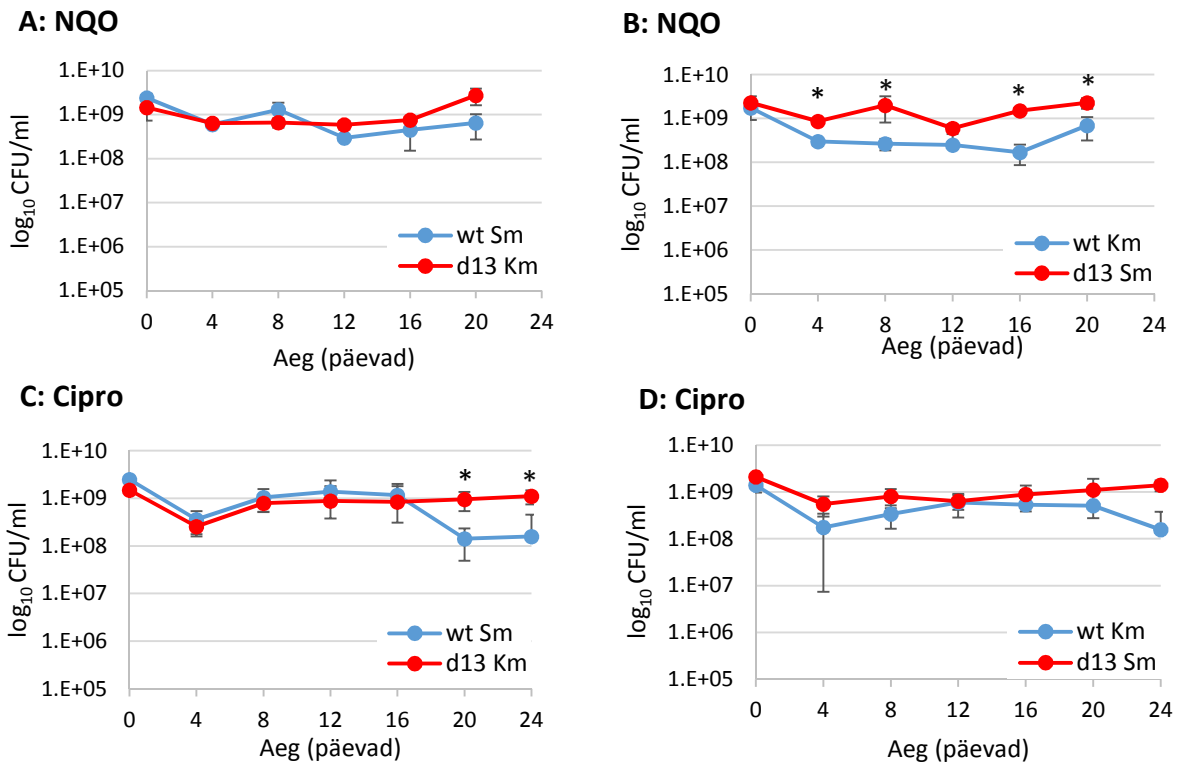
Kokultiveerimiskatsed viidi läbi nii LB vedelsöötmes kui ka LB vedelsöötmes erinevate kemikaalide juuresolekul (Joonised 4 - 6). Katsed kestsid 20-24 päeva.

LB söötmes tegin nii wt Sm: $\Delta 13Km$ kui wt Km: $\Delta 13Sm$ segakultuuridega kaks sõltumatut katseseeriat, seega kokku neli sõltumatut katset. Tulemused ei näidanud ühelgi juhul, et 13 TA süsteemi puudumine bakterite konkurentsivõimekust oluliselt mõjutaks, kusjuures tähtis polnud ka millise resistentsusgeeniga olid tüved märgistatud (Joonis 4). Ühes katses (Joonis 4A) ei olnud kahe tüve konkurentsivõimekuses statistiliselt olulist vahet (mõlema tüve puhul on kolooniaid moodustavaid ühikuid keskmiselt üle kõigi ajapunktide sama palju). Kolmes katses neljast täheldati $\Delta 13TA$ tüve mõningast konkurentsieelist algse tüve ees (Joonis 4, paneelid B-D), aga kuna neis katsetes oli statistiliselt oluline erinevus mõõdetav vaid mõnes katsepunktis, siis järeldan, et toitainerikkas LB söötmes kasvamisel pole kromosomaalsed TA süsteemid bakterile *P. putida* oluliselt kulukad. Siiski ei saa välistada võimalust, et 13 TA süsteemi puudumine võib anda bakterile väikese konkurentsieelise, sest punktides, kus kahe tüve konkurentsivõimes statistilist erinevust nähti, oli eelis alati $\Delta 13TA$ tüvel, kuid selle oletuse kinnitamiseks tuleks katseid korrata.



Joonis 4. 13 TA süsteemi ei mõjuta oluliselt *P. putida* konkurentsivõimet. Kanamütsiini või streptomütsiini resistentsusgeenidega märgistatud *P. putida* algset (wt Sm või wt Km) ja Δ 13TA tüve (d13 Km või d13 Sm) kasvatati 20 päeva segakultuuris temperatuuril 30°C LB söötmes. Iga kahe päeva järel külvati segakultuur edasi värskesse söötmesse ja iga nelja päeva järel määrati kummagi tüve kolooniaid moodustavate ühikute arv (CFU/ml). Esitatud on nelja paralleeli keskmine ja standardhälve. Tehti kaks sõltumatut katseseeriat (paneelid AB ja CD). Tärniga märgitud katsepunktid on kahe tüve osakaalud statistiliselt oluliselt erinevad (Wilcoxon'i astaksumma test, $p < 0,05$).

Antibiootikumistressi tekitamiseks lisati LB söötmele erinevaid kemikaale subinhibitoorses kontsentratsioonis: bensüülpenitsilliini (Bp; 150 μ g/ml), tsiprofloksatsiini (Cipro; 0,02 μ g/ml), nitrokinoliini (NQO; 40 μ M) või parakvaati (Para; 2 μ g/ml). Iga antibiootikumiga tegin ühe katseseeria. Sarnaselt LB söötmes kasvatamisele, ei ilmnenud ka tsiprofloksatsiini ega nitrokinoliiniga rikastatud LB söötmes kasvamisest, et 13 TA süsteemi puudumine oleks bakterite konkurentsivõimet oluliselt mõjutanud, kuna ka siin püsis kahe tüve suhe segakultuuris enamvähem muutumatuna (Joonis 5). Siiski tuleb märkida, et kahe katse mõnes ajapunktis oli täheldatav statistiliselt oluline erinevus tüvede osakaalus, kusjuures väike konkurentsieelis oli jällegi Δ 13TA tüvel (Joonis 5, paneelid B ja C). Kuna aga valdavalt jäi segakultuurides tüvede suhe ka nitrokinoliini ja tsiprofloksatsiini stressi juures muutumatuks ja tuvastatud statistiliselt olulised erinevused olid väikesed, võib sellest järeldada, et ka vastavate antibiootikumide stressi juures ei ole kromosomaalsed TA süsteemid *P. putida* jaoks ei kulukad ega kasulikud.



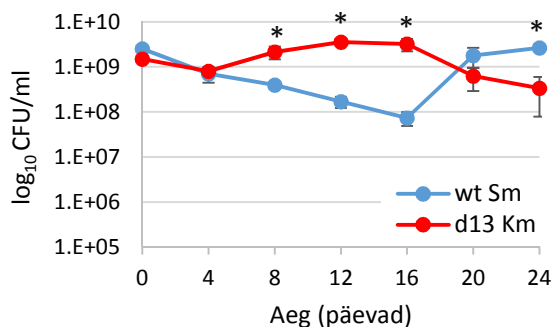
Joonis 5. 13 TA süsteemi puudumine ei mõjuta nitrokinoliini ega tsiprofloksatsiini stressi puhul oluliselt *P. putida* konkurentsivõimet. Kanamütsiini või streptomütsiini resistentsusgeenidega märgistatud *P. putida* algset (wt Sm või wt Km) ja Δ 13TA (d13 Sm või d13 Km) tüve kasvatati 20 (NQO) või 24 (Cipro) päeva segakultuuris temperatuuril 30°C LB söötmes, millele oli stressi tekitamiseks lisatud nitrokinoliini (NQO, 40 μ M; paneelid A ja B), või tsiprofloksatsiini (Cipro, 0,02 μ g/ml; paneelid C ja D). Iga kahe päeva järel külvati segakultuur edasi värskesse söötmesse ja iga nelja päeva järel määrati kummagi tüve kolooniaid moodustavate ühikute arv (CFU/ml). Esitatud on nelja paralleeli keskmine ja standardhälve. Kummagi antibiootikumiga viidi läbi üks katseeria. Täknega märgitud katsepunktides on kahe tüve osakaalud statistiliselt oluliselt erinevad (Wilcoxon'i astaksumma test, $p < 0,05$).

Bensüülpenitsilliini ja parakvaadi stressi puhul olid tulemused vastuolulised (Joonis 6). Bensüülpenitsilliini stressi juures kasvades langes ühes katses esmalt wt Sm tüve osakaal, ent katse lõpus tundus eelis olevat just wt Sm tüvel (Joonis 6A). Seejuures oli tüvede paariviisilisel hindamisel neljas katsepunktis seitsmest tuvastatud erinevus CFU-de arvus statistiliselt oluline (Joonis 6A). Kuna teises katses tüvede konkurentsivõimes statistilist erinevust ei olnud (Joonis 6B), siis ilmselt polegi tegelikkuses tüvede konkurentsivõimes erinevusi. Võib spekuloida, et kõikumine esimeses katses võib olla juhuslik või on nähtav hoopis katse käigus wt Sm tüvega toimunud mutatsiooni efekt. Põhjalikumate järelduste tegemiseks tuleks antud katset korrata.

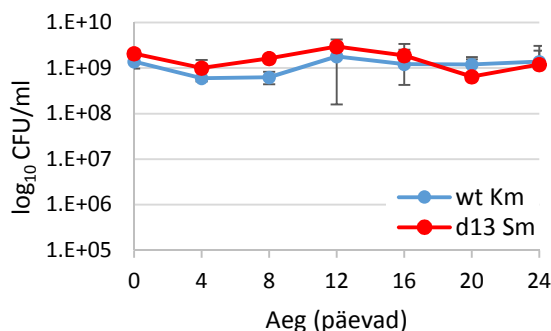
Ka parakvaadi stressi puhul olid tulemused vastuolulised, andes ühel juhul arvestatava konkurentsieelise metsiktüvele (Joonis 6C), mis võiks viidata sellele, et TA süsteemide olemasolu on *P. putida*'le parakvaadistressi talumisel oluline. Samas oli teises katses väike

konkurentsieelis deletsioontüvel (Joonis 6D), mis võib viidata sellele, et TA süsteemid võiksid bakterile koormaks olla. Kuna parakvaadiga viidi läbi ainult üks katseseeria ja see andis vastuolulised tulemused, siis järelduste tegemiseks tuleks katseid korrata ning seejuures võiks testida ka teistsuguseid parakvaadi kontsentratsioone.

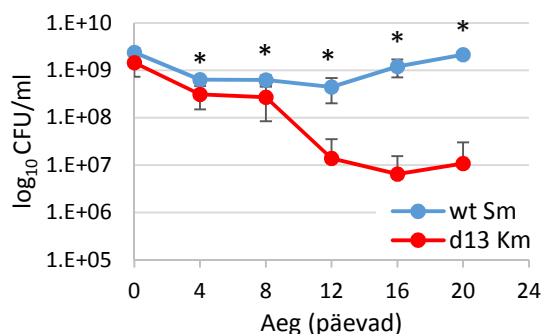
A: Bp



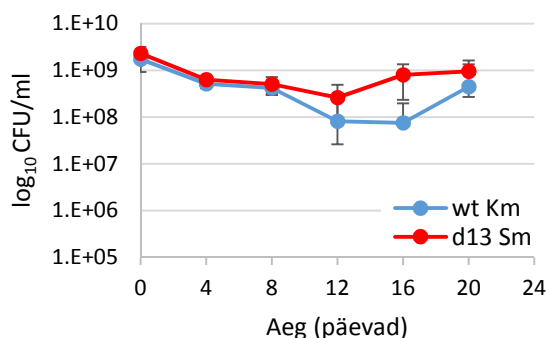
B: Bp



C: Para



D: Para



Joonis 6. 13 TA süsteemi puudumisel on tulemused *P. putida* konkurentsivõimele bensüülpenitsilliini ja parakvaadi stressi puhul vastuolulised. Kanamütsiini või streptomütsiini resistentsusgeenidega märgistatud *P. putida* algset (wt Sm või wt Km) ja Δ 13TA tüve (d13 Sm või d13 Km) kasvatati 20 (Para) või 24 (Bp) päeva segakultuuris temperatuuril 30°C LB söötmes, millele oli stressi tekitamiseks lisatud bensüülpenitsilliini (Bp, 150 µg/ml; paneelid A ja B) või parakvaati (Para, 2 µg/ml; paneelid C ja D). Iga kahe päeva järel külvati segakultuur edasi värskesse söötmesse ja iga nelja päeva järel määrati kummagi tüve kolooniaid moodustavate ühikute arv (CFU/ml). Esitatud on nelja paralleeli keskmine ja standardhälve. Viidi läbi üks katseseeria. Täkniga märgitud katsepunktides on kahe tüve osakaalud statistiliselt oluliselt erinevad (Wilcoxon'i astaksumma test, $p < 0,05$).

Kokkuvõtlikult võib öelda, et minu katsete tulemused ei toeta hüpoteesi, et kromosomaalsed TA süsteemid oleksid bakterile *P. putida* kulukad, kuna 13-ne TA süsteemi puudumine ei andnud Δ 13TA tüvele olulist konkurentsieelist algse tüve suhtes. Kuigi oli näha statistiliselt olulisi erinevusi mõningates katsepunktides, olid nähtud erinevused väikesed ja valdaval osal juhtudest püsis konkurentsikatse vältel tüvede vahetõrge segakultuuris samal tasemel. Seega järeldan, et vaatluse all olnud 13 TA süsteemi ei ole bakterile otseselt vajalikud, kuid samas ei ole ka oluliseks koormaks. Siiski peab välja tooma, et mõningatel juhtudel tuleks

põhjalikumate järelduste tegemiseks katseid korrata, kuna saadud tulemused olid vastuolulised (katsed bensüülpenitsilliini ja parakvaadiga).

2.3.2. *P. putida* operonide PP0770-0771 (*mazEF*), PP1480-1479 (*hicAB-1*) ja PP1268-1267 (*relBE*) kodeeritavad toksiidid on inaktiivsed

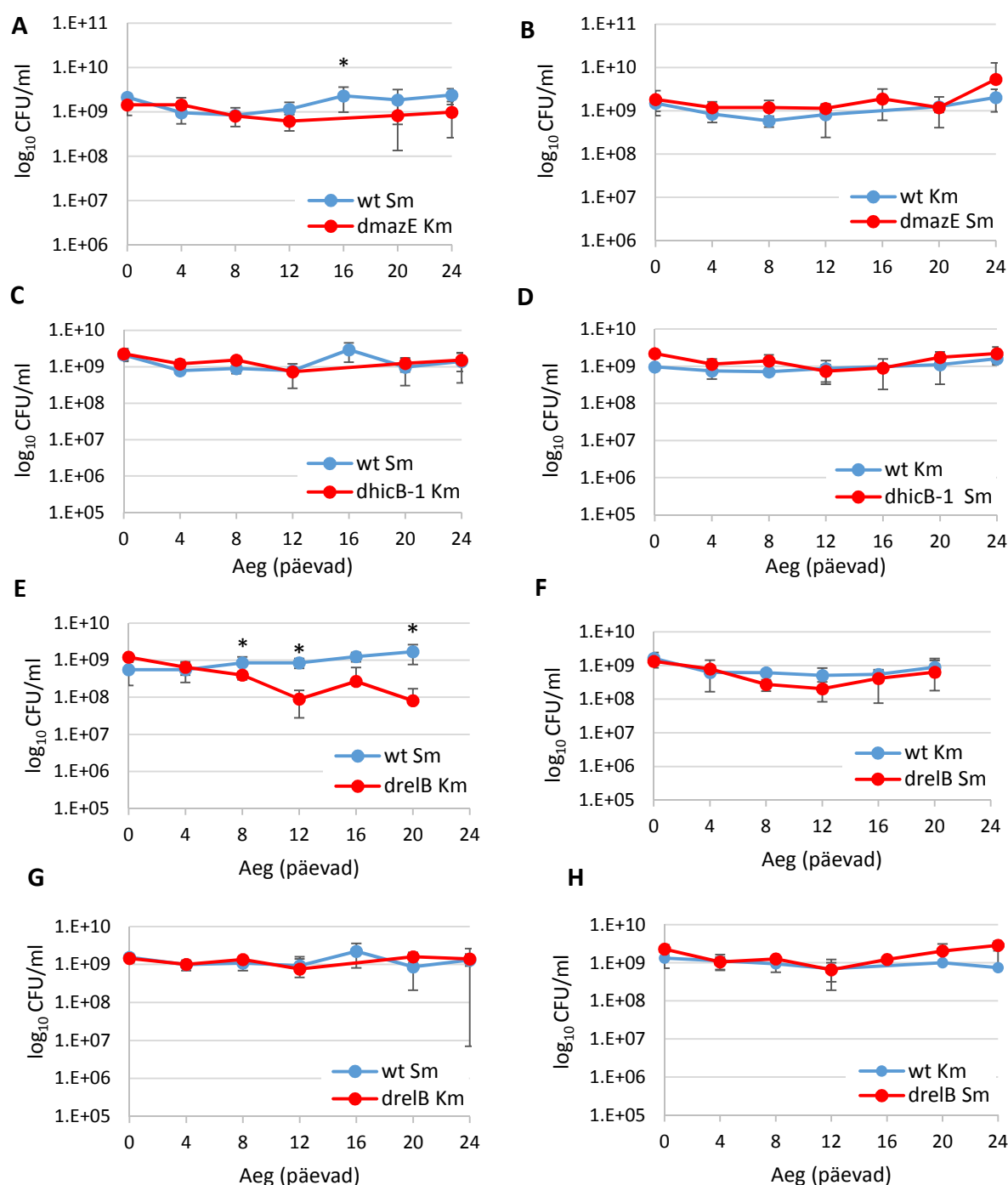
Laboris eelnevalt läbi viidud katsed *P. putida* mutantidega, mille PP0770-0771 (*mazEF*), PP1480-1479 (*hicAB-1*) või PP1268-1267 (*relBE*) lookustest oli eemaldatud antitoksiini geen viitasid, et nende TA süsteemide toksiidid on inaktiivsed (Luup, 2017; Rosendahl, publitseerimata andmed). Selleks, et selgitada nende TA süsteemide toksilisuse määra, otsustasime läbi viia konkurentsikatsed, mis oma tundlikkuse tõttu võiksid välja tuua ka toksiooni väikese mõju (juhul, kui toksiid pole päris inaktiivne). Kontrollina kaasasin katsesse ka MqsRA TA süsteemi, mille puhul on teada, et vastav operon kodeerib funktsionaalset mõõduka toksilisusega toksiooni (Luup, 2017; Tamman, publitseerimata).

Märgistasin $\Delta mazE$, $\Delta hicB-1$ ($\Delta 1479$), $\Delta relB$ ($\Delta 1268$) ja $\Delta mqsA$ antitoksiini deletsioontüved kanamütsiini ja streptomütsiini resistentsusgeeniga (Tabel 1). Analoogselt katsetele $\Delta 13TA$ tüvega, olid ka siin resistentsusgeeni efekti välistamiseks tüved märgistatud mõlemat pidi. Kontrollimaks, kas hüpotees MazF, HicA-1 ja RelB toksiidide inaktiivsusest vastab tõele, viisin *P. putida* antitoksiini deletsioonmutandi ja metsiktüve 1:1 segakultuuris läbi konkurentsikatsed (Joonis 7).

Nii $\Delta hicB-1$ ($\Delta 1479$) kui ka $\Delta mazE$ antitoksiinimutandiga viisin läbi ühe katseseeria. Kummagi mutandi puhul ei olnud võimalik tuvastada deletsioontüve paremust ega halvemust algse tüve suhtes (Joonis 7A-D). $\Delta hicB-1$ puhul ei olnud kummaski katses tüvede konkurentsivõimes statistilist erinevust (Joonis 7, paneelid C ja D). $\Delta mazE$ puhul oli ühel juhul tuvastatav statistiline erinevus ühes katsepunktis (Joonis 7A), kuid seejuures oli erinevus väga väike ja teises katses (Joonis 7B) tüvede konkurentsivõimes statistilist vahet ei olnud.

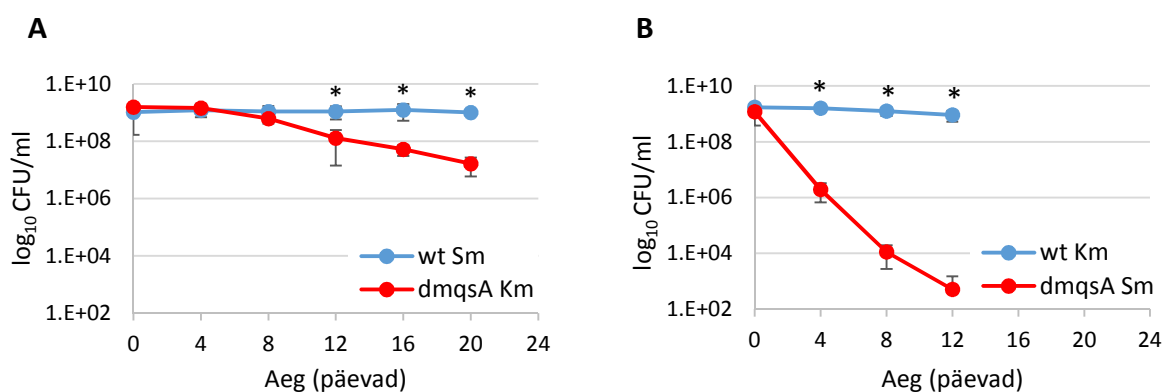
$\Delta relB$ ($\Delta 1268$) mutandiga viisin läbi kaks sõltumatut katseseeriat, mille tulemused ei olnud ühesed. Kui esimese katseseeria ühes katses tundus väike konkurentsieelis olevat algsel tüvel (Joonis 7E), siis korduskatseseerias kummalgi tüvel konkurentsieelist ei olnud (Joonis 7, paneelid G ja H).

Nendest tulemustest järeldan, et lookuste PP0770-0771 (*mazEF*), PP1480-1479 (*hicAB-1*) ja PP1268-1267 (*relBE*) kodeeritavad toksiidid MazF, HicA-1 ja RelE on kas inaktiivsed või on nende ekspressioonitase antud katsetingimustes väga madal.



Joonis 7. *P. putida* antitoksiinide MazE, HicB-1 ja RelB deleteerimine ei mõjuta bakterite konkurentsivõimet. Kanamütsiini või streptomütsiini resistentsusgeenidega märgistatud *P. putida* algset (wt Sm või wt Km) ja antitoksiini deletsioontüve (dmazE Sm või dmazE Km, dhicB-1 Sm või dhicB-1 Km, drelB Sm või drelB Km) kasvatati 20-24 päeva segakultuuris temperatuuril 30°C LB söötmes. Iga kahe päeva järel külvati segakultuur edasi värskesse söötmesse ja iga nelja päeva järel määrati kummagi tüve kolooniaid moodustavate ühikute arv (CFU/ml). Esitatud on nelja paralleeli keskmine ja standardhälve. Δ mazE ja Δ hicB-1 tüvedega viidi läbi üks katseseeria, Δ relB tüvega viidi läbi kaks sõltumatut katseseeriat. Tärniga märgitud katsepunktid on kahe tüve osakaalud statistiliselt oluliselt erinevad (Wilcoxon'i astaksumma test, $p < 0,05$).

Kuna eelnevalt oli teada, et MqsR on aktiivne toksiin, siis oli ootuspärane, et kontrollkatsed MqsA antitoksiini suhtes deletantse $\Delta mqsA$ tüvega näitasid MqsR toksiini mõju bakteri kohasusele – algsel tüvel oli selge konkurentsieelis $\Delta mqsA$ tüve suhtes (Joonis 8). Streptomütsiini resistentsusgeeni kandev $\Delta mqsA$ tüvi konkureeriti 12-ndaks päevaks algse tüve poolt välja (Joonis 8B). Kanamütsiini resistentsusgeeni kandva $\Delta mqsA$ tüve arvukus langes aeglasemalt, kuid samuti kindlalt (Joonis 8A). Oletasin, et erinevus $\Delta mqsA_Sm$ ja $\Delta mqsA_Km$ tüvede konkurentsivõimekuses võib tulla mutatsioonist toksiini geenis. Kasutatud tüvede sekveneerimisel ilmneski, et $\Delta mqsA_Km$ tüvel oli toksiini kodeerivas järjestuses mutatsioon – 8 nukleotiidi pikkune duplikatsioon, mis ilmselt vähendas toksiini toksilisust (Joonis 8A). Seega kinnitasid katsetulemused $\Delta mqsA$ tüvedega, et *mqsRA* operon kodeerib tõesti aktiivset toksiini.



Joonis 8. *P. putida* toksiin MqsR on toksiline. Kanamütsiini või streptomütsiini resistentsusgeenidega märgistatud *P. putida* algset (wt Sm või wt Km) ja $\Delta mqsA$ tüve (dmqsA Sm või dmqsA Km) kasvatati 20 päeva segakultuuris temperatuuril 30°C LB söötmes. Iga kahe päeva järel külvati segakultuur edasi värskesse söötmesse ja iga nelja päeva järel määrati kummagi tüve kolooniaid moodustavate ühikute arv (CFU/ml). Esitatud on nelja paralleeli keskmine ja standardhälve. Viidi läbi üks katseseeria. Täkniga märgitud katsepunktides on kahe tüve osakaalud statistiliselt oluliselt erinevad (Wilcoxon'i astaksumma test, $p < 0,05$).

2.4. Arutelu

TA süsteemid on bakterite genoomides väga levinud (Harms *et al.*, 2018; Leplae *et al.*, 2011; Pandey ja Gerdes, 2005). Seejuures võib individuaalse bakteri genoomis leiduda kümneid või isegi enam kui sada TA süsteemi (Akarsu *et al.*, 2019; Ramage *et al.*, 2009; Sala *et al.*, 2014). Kui plasmiidsete TA süsteemide bioloogiliseks funktsiooniks on teadaolevalt plasmidi säilitamine rakus (Gerdes *et al.*, 1986^a; Ogura ja Hiraga, 1983), siis kromosomaalsete süsteemide funktsiooni osas ühesele seisukohale jõutud ei ole. Kromosomaalsetele TA süsteemidele on välja pakutud mitmeid funktsioone ja valdavalt seostatakse neid ühel või teisel moel bakteri stressitaluvuse tõstmisega. Saadud tulemused on oma loomult aga mõneti teoreetilised, sest enamasti on TA süsteemide mõju uuritud bakteritüvedega, millel on antitoksiini geen deleteeritud või kus toksiine ekspresseeritakse üle. Teisalt lisab kromosomaalsete TA süsteemide funktsioonide selgitamisel küsimärke asjaolu, et vaatamata sellele, et paljud TA süsteemid kodeerivad aktiivseid valke, pole enamasti operoni eemaldamisel bakterile mingit mõju täheldatud. Seega viitavad TA süsteemide paljusus bakterite genoomides ning erinevate uuringute tulemused ühest küljest sellele, et kromosomaalsed TA süsteemid on bakterile kuidagi kasulikud – kodeeritakse aktiivseid valke, järelkult võiks seda ka millekski vaja minna. Teisest küljest aga viitaks bakteri nõuiskõiksus TA operoni deleteerimise suhtes justkui sellele, et bakterile ei ole TA süsteemidest ei kasu ega ka kahju.

2.4.1. Kromosomaalsete TA süsteemide kulukus bakterile *P. putida*

P. putida TA süsteemide osas läbi viidud uuringud näitavad, et valdav osa *P. putida* TA süsteeme on funktsionaalsed ja kodeerivad aktiivset toksiini (Ainelo *et al.*, 2016; Luup, 2017; Tamman *et al.*, 2014; Rosendahl, publitseerimata). Lisaks on teada, et *P. putida* toksiin GraT mõjutab bakteri kohasust, aga vaid juhul kui antitoksiini geen on kromosoomist eemaldatud (Tamman *et al.*, 2014).

Kirjanduses on spekulieritud, et TA süsteemid võivad toimida sünergiliselt ja mitme TA süsteemi deleteerimisel võib olla bakteri kohasusele kumulatiivne efekt (Yamaguchi ja Inouye, 2011). Selles osas kirjandusest leitavad väited on siiski vastuolulised: kui Tsilibaris *et al.* (2007) leidsid, et viie TA süsteemi puudumine ei mõjuta *E. coli* kohasust ja stressitolerantsust, siis Kim *et al.* (2009) poolt läbi viidud uuringus on jõutud vastupidiste järeldusteni – katsetes, kus uuriti biofilmi moodustumist, leiti, et viie TA süsteemi puudumine mõjutab *E. coli* biofilmi moodustumise võimet. Luup (2017) puudutas oma töös samuti küsimust mitmete TA süsteemide olulisusest ja järeldas, et 13 TA süsteemi puudumine *P.*

putida kohasusele ega stressitaluvusele olulist mõju ei avalda ning kui mõju üldse on, siis on see kas väga väike või ilmneb vaid teatud stressitingimustel. Seega toetavad Luup (2017) *P. putida*'s saadud tulemused pigem Tsilibaris *et al.* (2007) *E. coli*'ga tehtud katsete järeldust, et TA mitmikmutandi kohasus pole metsiktüvega võrreldes oluliselt muutunud.

Käesolevas töös analüüsisin kromosomaalsete TA süsteemide võimalikku kulukust bakterile *P. putida* konkurentsikatsete varal, kuna konkurentsikatse suur tundlikkus võiks TA süsteemide (või nende puudumise) väikese mõju välja tuua. Katsetulemused $\Delta 13TA$ tüve ja algse tüvega viitavad aga, et 13 TA süsteemi ei ole *P. putida*'le kulukad, sest vähemalt antud katsetingimustel ei andnud 13 TA süsteemi puudumine bakterile olulist konkurentsieelist ei rikkas söötmes (LB) (Joonis 4) ega antibiootikumistressi (NQO, Cipro) korral (Joonis 5). Parakvaadiga ja bensüülpenitsilliiniga tehtud katsed $\Delta 13TA$ ja algse tüvega andsid vastuolulised tulemused. Samas tehti neil tingimustel vaid üks katseseeria ja seetõttu on nendest tulemustest järelduste tegemine hetkel ennatlik.

Arvestades, et uuritud 13-st TA süsteemi toksiinist on viis toksilised ja neli säilitanud osalise aktiivsuse (Luup, 2017; Rosendahl, publitseerimata; Joonis 8), tekib küsimus, miks ei ole TA süsteemide eemaldamisel bakteri konkurentsivõimele mõju näha. Võib-olla pole kromosomaalsete TA süsteemide eemaldamise mõjusid bakteri kohasusele näha seetõttu, et *P. putida* algses tüves ei pääse toksiin kunagi antitoksiini kontrolli alt. Kui antitoksiini on rakkudes alati rohkem kui toksiini, ei jää toksiin kunagi üksi ja ei pääse oma märklauda inhibeerima. Sestap oleks edaspidi huvitav püüda määrata bakteris antitoksiini/toksiini reaalsel suhet. Erinevalt plasmiidist ei kao kromosomaalsed geenid üldjuhul kuhugi ja antitoksiini süntees ei lakka – see oleks mõeldav vaid genoomsete mobiilsete elementide, näiteks profaagide puhul. Siinjuures olekski huvitav mainida, et *P. putida* TA lookus PP3899-PP3900, mida pole $\Delta 13TA$ tüvest deleteeritud stabiliseerib genoomis profaagi P1 ja kui see lookus deleteerida, lahkub bakteri genoomist ka profaag (Luup, 2017). Sealjuures suurendab P1 profaagi genoomist lahkumine *P. putida* tolerantsust UV kiirguse suhtes (Luup, 2017; Martínez-García *et al.*, 2015).

Kuigi käesolev uuring näitas, et 13 TA süsteemi ei vähenda olulisel määral *P. putida* üldist konkurentsivõimekust, tuleb siiski välja tuua, et mõningates katsetes võis näha pisikest konkurentsieelist $\Delta 13TA$ mutandil (Joonis 4, paneelid B-D; Joonis 5, paneelid A-D). Nähtud erinevused olid küll väikesed, aga see viitab, et mingisugust kulukust TA süsteemide omamine endas siiski kätkeb. Selguse huvides tuleks aga katseid korrata ja võib-olla testida seejuures ka erinevaid antibiootikumide kontsentratsioone. Sarnast tendentsi ($\Delta 13TA$ konkurentsieelist) on täheldatud ka meie laboris läbi viidud S. Rosendahli teostatud katsete

puhul, kus võrdluses metsiktüvega on konkurentsieelis, juhul kui see esineb, $\Delta 13TA$ tüvel (seitsmest katseseeriast neljas). Samas ei ole $\Delta 13TA$ tüve konkurentsieelis üheski katses olnud nii suur, et ta suudaks metsiktüve välja konkureerida (Rosendahl, publitseerimata). Seega viitavad needki tulemused, et kui ka TA süsteemid võivad bakteri jaoks kulukad olla, siis see kulu on väga väike ja mõjutab bakteri kohasust vähe. Siin võib spekuloida, et ilmselt on kromosomaalsed TA süsteemid evolutsioneerunud nii, et nende kahju peremehele oleks minimaalne.

2.4.2. *P. putida* TA süsteemide kodeeritavate toksiinide funktsionaalsus

P. putida TA süsteemide kodeeritavate toksiinide funktsionaalsust on käsitletud mitmetes uuringutes. Siiani on näidatud, et *graTA* operoni kodeeritav toksiin GraT on funktsionaalne ja mõjutab ka bakteri kohasust (Luup, 2017; Tamman *et al.*, 2014). Kirjanduse andmetel on ka *mazEF*, *mqsRA* ja *res-xre* operonide kodeeritavad toksiinid funktsionaalsed (Miyamoto *et al.*, 2016; Skjærning *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2017).

Saamaks kinnitust hüpoteesile mõningate *P. putida* TA süsteemide kodeeritavate toksiinide inaktiivsusest, viidi käesoleva töö raames läbi konkurentsikatsed *P. putida* TA süsteemide antitoksiini deletsioonmutantidega. Kontrollimaks, kas toksiin tõesti on inaktiivne, valiti konkurentsikatse jaoks kolm tüve, mille puhul arvati, et toksiin on inaktiivne (tüved $\Delta relB$ ($\Delta 1268$), $\Delta hicB-1$ ($\Delta 1479$) ja $\Delta mazE$) (Luup, 2017; Rosendahl, publitseerimata). Kui toksiin ei oleks inaktiivne, siis konkurentsikatse tundlikkus peaks olema piisav selleks, et ka väikeseid erinevusi nähtavale tuua. Kontrollina kaasati katsesse *MqsRA* süsteemi antitoksiini deletsiooniga $\Delta mqsA$ tüvi. Kirjandusest on teada, et *P. putida mqsRA* operon on funktsionaalne ja kodeerib mõõduka toksilisusega toksiini, kuna *mqsA* eemaldamine bakteri genoomist on võimalik, kuid see pärsib mõnevõrra bakterite kasvukiirust ja mõjutab stressitolerantsust (Luup, 2017; Sun *et al.*, 2017). Seega eeldasime, et see tüvi peaks funktsionaalse toksiini tõttu konkurentsikatses kiiresti algse tüve poolt välja tõrjutama. Seda ka käesolevas uurimuses läbi viidud katsed näitasid, sest antitoksiini deletsiooniga tüvi konkureeriti metsiktüve poolt ruttu välja (Joonis 8B).

Konkurentsikatsed antitoksiini deletsioonmutantidega $\Delta relB$ ($\Delta 1268$) ja $\Delta hicB-1$ ($\Delta 1479$) kinnitasid hüpoteesi vastavate toksiinide inaktiivsusest. *hicB-1* puudumine ei avaldanud võrdluses metsiktüvega bakterite konkurentsivõimele mingit mõju (Joonis 7, paneelid C ja D). *relB* deleteerimisel võis kahes katseseerias statistilist erinevust näha vaid ühes katses, kus väike konkurentsieelis tundus olevat algsel tüvel (Joonis 7E), kuid kuna ülejäänud kolmes

katses algse tüve ja deletsioontüve konkurentsivõime ei erinenud (Joonis 7, paneelid F-H), siis järeldan, et nii RelE kui HicA-1 on inaktiivsed või ekspresseeritakse neid väga madalal tasemel.

Seni ainsas *P. putida* MazEF süsteemi käsitlevas artiklis on *in vitro* katsetes leitud, et MazF toksiin on funktsionaalne (Miyamoto *et al.*, 2016), kuid meie laboris läbi viidud *in vivo* katsed Δ mazE antitoksiini mutantidega (Luup, 2017) viitavad, et tegelikkuses *P. putida* kromosomaalsest lookusest MazF toksiini kas ei ekspresseerita või on MazF valk inaktiivne. Luup (2017) tulemust kinnitasid ka käesoleva katse tulemused, sest antitoksiini deletsioontüve Δ mazE ja algse tüve konkurentsivõime ei erinenud (Joonis 7, paneelid A ja B). Ühtlasi rõhutavad käesoleva töö ja Luup (2017) katsete tulemused asjaolu, et toksiinide mõju uurimisel ei tohiks piirduda vaid *in vitro* katsetega, sest *in vitro* katsetes saadud tulemused ei pruugi *in vivo* kehtida. Analooigse järelduse saab näiteks teha ka *P. putida* RES-Xre süsteemi uuringute osas, kus Skjærning *et al.* (2019) poolt teostati katsed üleekspresseeritud valguga ning seejuures tehti toksiini toksilisuse tagamiseks muudatusi nii *P. putida res* geeni stardikoodonis kui ka Shine Dalgarno järjestuses. Luup (2017) *in vivo* katsetes aga *xre* deletsioonil bakteri kasvukiirusele mõju ei täheldatud. Toksiini rudimentaalsest aktiivsusest andis aimu vaid veidi vähenenud antibiootikumitaluvus.

Kokkuvõtlikult võib katsetest antitoksiini deletsioontüvedega järeldada, et *P. putida* toksiinid MazF, HicA-1 ja RelE on inaktiivsed ja pole tõenäoline, et need TA süsteemid bakterile mingit bioloogilist tähtsust omaks.

KOKKUVÕTE

Kromosomaalsed toksiin-antitoksiin süsteemid on bakterites laialdaselt levinud. Vaatamata aastakümnete pikkusele uurimistööle, ei ole aga siiani kromosomaalsete TA süsteemide funktsioone täpselt kaardistada suudetud. Üldjuhul seostatakse neid bakterite vastupanuvõime tõstmisega erinevatele stressoritele. Samas on mitmed uuringud näidanud, et tervete TA operonide eemaldamine bakterite genoomist ei pruugi bakterite kohasust mõjutada. See tõstatab küsimuse – milleks, kui üldse, on bakteritele TA süsteeme vaja.

Ka *P. putida*'s läbi viidud uuringuid näitavad, et kuigi valdav osa *P. putida* TA operonidest kodeerivad funktsionaalseid toksiine, siis 13 TA operoni eemaldamine ei mõjuta bakteri kohasust ega stressitaluvust.

Kuna TA süsteemid on bakteritele potentsiaalselt toksilised, on loogiline eeldada, et TA geenid on bakterile kulukad ja seega tugeva valikusurve all. Käesoleva töö eesmärkideks oli uurida, kas kromosomaalsed TA süsteemid on bakterile *P. putida* kulukad ning selgitada ka mõningate *P. putida* toksiinide toksilisuse määra konkurentsikatses. Uurimistöö tulemusena saab teha järgnevad järeldused:

- 1) 13 TA süsteemi puudumine ei mõjuta oluliselt *P. putida* konkurentsivõimet ei rikkas söötmes aga ka antibiootikumistressi tingimustes;
- 2) *P. putida* operonide PP0770-0771 (*mazEF*), PP1480-1479 (*hicAB-1*) ja PP1268-1267 (*relBE*) kodeeritavad toksiinid on inaktiivsed;
- 3) *P. putida* MqsRA süsteem kodeerib aktiivset toksiini.

Seega võib öelda, et antud uuringu tulemused ei näita, et *P. putida*'le oleks kromosomaalsed TA süsteemid otseselt kasulikud (vastasel juhul oleks metsiktüvel $\Delta 13TA$ deletsioontüve ees näha mingisugust konkurentsieelist), kuid samas ei tundu TA süsteemid antud katse tulemustele tuginedes ka bakteritele oluliseks koormaks olevat (vastasel juhul oleks pidanud katsetes nägema $\Delta 13TA$ tüve konkurentsieelist metsiktüve ees). $\Delta 13TA$ mutantidega läbi viidud katsete puhul tuleb siiski märkida, et katsetes, kus ühel tüvel teise suhtes üldse mingit konkurentsieelist oli võimalik täheldada, oli enamasti eelis (kuigi väike) just $\Delta 13TA$ tüvel. Seega ei saa välistada võimalust, et TA süsteemide omamine *P. putida*'le mingil määral ikkagi kulukas on. Seega võib käesoleva uuringu tulemusena öelda, et vähemalt *P. putida* jaoks tundub, et TA süsteemide omamisel ei ole bakteri jaoks otseselt hinda (või kui, siis on see hind väike), mis lubab spekuloida, et valikusurve nende TA süsteemide genoomist eemaldamiseks on samuti nõrk.

The Cost of Chromosomal Toxin-Antitoxin Systems to *Pseudomonas putida*

Krista Rooni

SUMMARY

Toxin-antitoxin systems (TA systems) are two-component genetic modules that code for a stable toxin and an unstable antitoxin. The protein toxin, if activated, is capable of inhibiting cell growth. The antitoxin is a protein or a small noncoding RNA which inhibits the activation of the toxin, either by direct interaction with the toxin or through transcriptional or translational regulation of TA module expression (Page and Peti, 2016). Initially, TA systems were discovered in plasmids where they function as a plasmid maintenance mechanism (Gerdes *et al.*, 1986^a). Plasmid loss results in the rapid degradation of the antitoxin, enabling toxin activation which leads to cell death or a decreased growth rate. Later on, it was discovered that TA systems are abundant in bacterial chromosomes (Yamaguchi *et al.*, 2011). Generally, chromosomal TA systems are thought to be involved in bacterial stress response, helping bacteria to survive in stressful environments. Nevertheless, the exact functions of the TA loci are still not fully understood.

The abundance of chromosomal TA loci in bacteria, coupled with the fact that most of the loci code for functional toxin, gives reason to presume that the TA systems must be of use to the bacteria. However, several studies have shown that whole TA operons can be removed from the bacterial genome without having an effect on its fitness (Tamman *et al.*, 2014; Tsilibaris *et al.*, 2007; Unoson and Wagner, 2008). The studies conducted on *P. putida* have revealed that whilst most of the 15 TA operons in *P. putida* code for functional toxins, the deletion of 13 TA loci does not affect bacterial fitness or stress tolerance (Luup, 2017).

TA systems are potentially toxic for bacteria. Therefore, it is reasonable to assume that the TA genes are costly for bacteria and as a result under strong selection pressure. The aim of this research was to determine if chromosomal TA systems are costly for *P. putida*. In addition, the range of toxic effects of four *P. putida* toxins was tested via competition assays. The results revealed the following:

- 1) The absence of 13 chromosomal TA systems does not have a significant effect on the competitiveness of *P. putida* in rich media (LB) nor in the presence of antibiotic stress;

- 2) The *P. putida* operons PP0770-0771 (*mazEF*), PP1480-1479 (*hicAB-I*) and PP1268-1267 (*relBE*) code for non-functional toxins;
- 3) The *P. putida* operon *mqsRA* codes for a functional toxin.

The results indicate that chromosomal TA systems do not seem to be essential for *P. putida* but at the same time, TA systems do not appear to be costly for the bacteria, either. In the case of the experiments with the $\Delta 13TA$ deletion strain, it is worth mentioning that in experiments where any difference in competitiveness was detected, the $\Delta 13TA$ mutant seemed to have a slight competition advantage in relation to the wild type strain. Therefore, the possibility that TA systems might be somewhat costly for *P. putida* cannot be ruled out.

The results indicate that for *P. putida* having chromosomal TA systems is not costly or the cost of having the systems is very low, which allows to infer that the selective pressure to remove these systems from the bacteria's chromosome is low as well.

TÄNUSÕNAD

Tänan oma juhendajaid Ritat ja Sirlit suurepärase juhendamise eest.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Aakre, C. D., Phung, T. N., Huang, D. ja Laub, M. T. (2013). A Bacterial Toxin Inhibits DNA Replication Elongation Through a Direct Interaction with the β Sliding Clamp. Mol Cell, **52**(5): 617–628.
- Afif, H., Allali, N., Couturier, M. ja van Melder, L. (2001). The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the ccd poison – antidote system. Mol Microbiol, **41**(1): 73–82.
- Ainelo, A. (2018). Physiological effects of the *Pseudomonas putida* toxin GraT. Doktoritöö, Tartu Ülikool.
- Ainelo, A., Porosk, R., Kilk, K., Rosendahl, S., Remme, J. ja Hõrak, R. (2019). *Pseudomonas putida* Responds to the Toxin GraT by Inducing Ribosome Biogenesis Factors and Repressing TCA Cycle Enzymes. Toxins (Basel), **11**(2): 103.
- Ainelo, A., Tamman, H., Leppik, M., Remme, J. ja Hõrak, R. (2016). The toxin GraT inhibits ribosome biogenesis. Mol Microbiol, **100**(4): 719–734.
- Akarsu, H., Bordes, P., Mansour, M., Bigot, D.-J., Genevau, P. ja Falquet, L. (2019). TASmania: A bacterial Toxin-Antitoxin Systems database. PLOS Comput Biol, **15**(4): e1006946.
- Alawneh, A. M., Qi, D., Yonesaki, T. ja Otsuka, Y. (2016). An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the *Escherichia coli* MazF toxin of a toxin-antitoxin module. Mol Microbiol, **99**(1): 188–198.
- Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A. ja Kulka, H. E. (2009). *Escherichia coli* MazF Leads to the Simultaneous Selective Synthesis of Both ‘Death Proteins’ and ‘Survival Proteins’. PLoS Genet, **5**(3): e1000390.
- Baharoglu, Z. ja Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. FEMS Microbiol Rev, **38**(6): 1126–1145.
- Bao, Y., Lies, D. P., Fu, H. ja Roberts, G. P. (1991). An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of Gram-negative bacteria. Gene, **109**: 167–168.
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G. ja Broda, P. (1977). Two Modes of Loss of the Tol Function from *Pseudomonas putida* mt-2. Mol Gen Genet MGG, **154**(2): 203–204.
- Blower, T. R., Short, F. L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X. Y., Fineran, P. C., Luisi, B. F., Salmond, G. P. C. (2012). Identification and classification of bacterial Type III toxin – antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. Nucleic Acids Res, **40**(13): 6158–6173.
- Brantl, S. (2012). Bacterial type I toxin-antitoxin systems. RNA Biol, **9**(12): 1488–1490.
- Brantl, S. ja Müller, P. (2019). Toxin – Antitoxin Systems in *Bacillus subtilis*. Toxins, **11**(5): 262.
- Brown, B. L., Lord, D. M., Grigoriu, S., Peti, W. ja Page, R. (2013). The *Escherichia coli* Toxin MqsR Destabilizes the Transcriptional Repression Complex Formed between the Antitoxin MqsA and the mqsRA Operon Promoter. J Biol Chem, **288**(2): 1286–1294.
- Brzozowska, I. ja Zielenkiewicz, U. (2013). Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis. Plasmid, **70**(1): 33–41.

- Castro-Roa, D., Garcia-Pino, A., De Gieter, S., van Nuland, N. A. J., Loris, R. ja Zenkin, N. (2013). The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu. Nat Chem Biol, **9**(12): 811–817.
- Chan, W. T., Espinosa, M. ja Yeo, C. C. (2016). Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. Front Mol Biosci, **3**: 9.
- Cheverton, A. M., Gollan, B., Przydacz, M., Wong, C. T., Mylona, A., Hare, S. A. ja Helaine, S. (2016). A Salmonella Toxin Promotes Persister Formation through Acetylation of tRNA. Mol Cell, **63**(1): 86–96.
- Christensen, S. K., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Gottesman, S., Gerdes, K. ja van Melder, L. (2004). Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in Escherichia coli: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. Mol Microbiol, **51**(6): 1705–1717.
- Christensen, S. K., Mikkelsen, M., Pedersen, K. ja Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. Proc Natl Acad Sci, **98**(25): 14328–14333.
- Cohen, N. R., Lobritz, M. A. ja Collins, J. J. (2013). Microbial persistence and the road to drug resistance. Cell Host Microbe, **13**(6): 632–642.
- Cook, G. M., Robson, J. R., Frampton, R. A., McKenzie, J., Przybiski, R., Fineran, P. C. ja Arcus, V. L. (2013). Ribonucleases in bacterial toxin–antitoxin systems. Biochim Biophys Acta, **1829**(6–7): 523–531.
- Cooper, T. F. ja Heinemann, J. A. (2000). Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. Proc Natl Acad Sci U S A, **97**(23): 12643–12648.
- Deter, H. S., Jensen, R. V., Mather, W. H. ja Butzin, N. C. (2017). Mechanisms for differential protein production in toxin–antitoxin systems. Toxins, **9**: 211.
- Díaz-Orejás, R., Espinosa, M. ja Yeo, C. C. (2017). The importance of the expendable: Toxin-antitoxin genes in plasmids and chromosomes. Front Microbiol, **8**: 1–7.
- Dörr, T., Vulić, M. ja Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in Escherichia coli. PLoS Biol, **8**(2): e1000317.
- Dufour, D., Mankovskaia, A., Chan, Y., Motavaze, K., Gong, S. G. ja Lévesque, C. M. (2018). A tripartite toxin-antitoxin module induced by quorum sensing is associated with the persistence phenotype in Streptococcus mutans. Mol Oral Microbiol, **33**(6): 420–429.
- Dy, R. L., Przybiski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P. C. ja Fineran, P. C. (2014). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism. Nucleic Acids Res, **42**(7): 4590–4605.
- Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S. ja Salmond, G. P. C. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin – antitoxin pair. Proc Natl Acad Sci U S A, **106**(3): 894–899.
- Fozo, E. M., Hemm, M. R. ja Storz, G. (2008). Small Toxic Proteins and the Antisense RNAs That Repress Them. Microbiol Mol Biol Rev, **72**(4): 579–589.
- Freire, D. M., Gutierrez, C., Garza-Garcia, A., ... Neyrolles, O. (2019). An NAD⁺ Phosphorylase Toxin Triggers Mycobacterium tuberculosis Cell Death. Mol Cell, **73**(6): 1282–1291.
- Gerdes, K., Rasmussen, P. B. ja Molin, S. (1986^a). Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. Proc Natl Acad Sci, **83**(10): 48

- Gerdes, K., Bech, F. W., Jorgensen, S. T., Lobner-Olesen, A., Rasmussen, P. B., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S., von Meyenburg, K. (1986^b). Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli* *relB* operon. *EMBO J*, **5**(8): 2023–2029.
- Gerdes, K., Christensen, S. K. ja Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol*, **3**(5): 371–382.
- Goeders, N. ja Van Melderren, L. (2014). Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins*, **6**(1): 304–324.
- González Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E. ja Wood, T. K. (2006). Autoinducer 2 Controls Biofilm Formation in *Escherichia coli* through a Novel Motility Quorum-Sensing Regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol*, **188**(1): 305–316.
- Goormaghtigh, F., Fraikin, N., Putrinš, M., ... van Melderren, L. (2018). Reassessing the Role of Type II Toxin-Antitoxin Systems in Formation of *Escherichia coli* Type II Persister Cells Frédéric. *MBio*, **9**(3): e00640-18.
- Guglielmini, J. ja Van Melderren, L. (2011). Bacterial toxin-antitoxin systems: translation inhibitors everywhere. *Mob Genet Elements*, **1**(4): 283–290.
- Hallez, R., Geeraerts, D., Sterckx, Y., Mine, N., Loris, R. ja Van Melderren, L. (2010). New toxins homologous to ParE belonging to three-component toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol*, **76**(3): 719–732.
- Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N. ja Gerdes, K. (2018). Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. *Mol Cell*, **70**(5): 768–784.
- Harms, A., Fino, C., Sørensen, M. A., Semsey, S. ja Gerdes, K. (2017). Prophages and Growth Dynamics Confound Experimental Results with Antibiotic-Tolerant Persister Cells. *MBio*, **8**(6): e01964-17.
- Harms, A., Stanger, F. V., Scheu, P. D., de Jong, I. G., Goepfert, A., Glatter, T., Gerdes, K., Schirmer, T., Dehio, C. (2015). Adenylation of Gyrase and Topo IV by FicT Toxins Disrupts Bacterial DNA Topology. *Cell Rep*, **12**(9): 1497–1507.
- Hayes, C. S. ja Sauer, R. T. (2003). Toxin-Antitoxin Pairs in Bacteria: Killers or Stress Regulators? *Cell*, **112**(1): 2–4.
- Jørgensen, M. G., Pandey, D. P., Jaskolska, M. ja Gerdes, K. (2009). HicA of *Escherichia coli* Defines a Novel Family of Translation-Independent mRNA Interferases in Bacteria and Archaea. *J Bacteriol*, **191**(4): 1191–1199.
- Jurénas, D., Chatterjee, S., Konijnenberg, A., Sobott, F., Droogmans, L., Garcia-Pino, A. ja van Melderren, L. (2017^a). AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA^{fMet}. *Nat Chem Biol*, **13**(6): 640–646.
- Jurénas, D., Garcia-Pino, A. ja Van Melderren, L. (2017^b). Novel toxins from type II toxin-antitoxin systems with acetyltransferase activity. *Plasmid*, **93**: 30–35.
- Kasari, V., Kurg, K., Margus, T., Tenson, T. ja Kaldalu, N. (2010). The *Escherichia coli* *mqsR* and *ygiT* Genes Encode a New Toxin-Antitoxin Pair. *J Bacteriol*, **192**(11): 2908–2919.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. ja Lewis, K. (2004). Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **186**(24), 8172–8180.

- Kim, Y., Wang, X., Ma, Q., Zhang, X. S. ja Wood, T. K. (2009). Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. J Bacteriol, **191**(4): 1258–1267.
- Kim, Y., Wang, X., Zhang, X., Grigoriu, S., Page, R., Peti, W. ja Wood, T. K. (2010). *Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD. Environ Microbiol, **12**(5): 1105–1121.
- Kim, Y. ja Wood, T. K. (2010). Toxins Hha and CspD and Small RNA Regulator Hfq Are Involved in Persister Cell Formation Through MqsR in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, **391**(1): 209–213.
- Koch, B., Jensen, L. E. ja Nybroe, O. (2001). A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. J Microbiol Methods, **45**: 187–195.
- Koga, M., Otsuka, Y., Lemire, S. ja Yonesaki, T. (2011). *Escherichia coli* *rnlA* and *rnlB* Compose a Novel Toxin–Antitoxin System. Genetics, **187**(1): 123–130.
- Kwan, B. W., Lord, D. M., Peti, W., Page, R., Benedik, M. J. ja Wood, T. K. (2015). The MqsR/MqsA toxin/antitoxin system protects *Escherichia coli* during bile acid stress. Environ Microbiol, **17**(9): 3168–3181.
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Dreze, P. ja van Melderen, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin – antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. Nucleic Acids Res, **39**(13): 5513–5525.
- Loris, R. ja Garcia-Pino, A. (2014). Disorder- and Dynamics-Based Regulatory Mechanisms in Toxin–Antitoxin Modules. Chem Rev, **114**(13): 6933–6947.
- Luup, S. (2017). Toksiin-antitoksiin süsteemide mõju *Pseudomonas putida* kohasusele ja stressitaluvusele. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M. ja Gerdes, K. (2013). (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. Cell, **154**(5): 1140–1150.
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M. ja Gerdes, K. (2018^a). Retraction Notice to: (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. Cell, **172**(5): 1135.
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L. J. ja Girke, M. (2018^b). Retraction for Maisonneuve et al., Bacterial persistence by RNA endonucleases. Proc Natl Acad Sci, **115**(12): E2901.
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L. J., Jørgensen, M. G. ja Gerdes, K. (2011). Bacterial persistence by RNA endonucleases. Proc Natl Acad Sci, **108**(32): 13206–13211.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I. ja Koonin, E. V. (2009). Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. Biol Direct, **4**: 19.
- Marimon, O., Teixeira, J. M. C., Cordeiro, T. N., ... Pons, M. (2016). An oxygen-sensitive toxin-antitoxin system. Nat Commun, **7**: 13634.
- Martínez-García, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M. ja de Lorenzo, V. (2015). Freeing *Pseudomonas putida* KT2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses. Environ Microbiol, **17**(1): 76–90.
- Masuda, H. ja Inouye, M. (2017). Toxins of prokaryotic toxin-antitoxin systems with sequence-specific endoribonuclease activity. Toxins, **9**: 140.

- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K. ja Inouye, M. (2012). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, **84**(5): 979–989.
- Merfa, M. V., Niza, B., Takita, M. A. ja De Souza, A. A. (2016). The MqsRA toxin-antitoxin system from *Xylella fastidiosa* plays a key role in bacterial fitness, pathogenicity, and persister cell formation. Front Microbiol, **7**: 904.
- Mets, T., Kasvandik, S., Saarma, M., Maiväli, Ü., Tenson, T. ja Kaldalu, N. (2019). Fragmentation of *Escherichia coli* mRNA by MazF and MqsR. Biochimie, **156**: 79–91.
- Miyamoto, T., Kato, Y., Sekiguchi, Y., Tsuneda, S. ja Noda, N. (2016). Characterization of MazF-Mediated Sequence-Specific RNA Cleavage in *Pseudomonas putida* Using Massive Parallel Sequencing. PLoS One, **11**(2): e0149494.
- Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R. L. ja Meinhart, A. (2011). A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. PLoS Biol, **9**(3): e1001033.
- Ogura, T. ja Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. Proc Natl Acad Sci, **80**(15): 4784–4788.
- Otsuka, Y. ja Yonesaki, T. (2012). Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsaA and RnlA toxins. Mol Microbiol, **83**(4): 669–681.
- Overgaard, M., Borch, J., Jørgensen, M. G. ja Gerdes, K. (2008). Messenger RNA interferase RelE controls relBE transcription by conditional cooperativity. Mol Microbiol, **69**(4): 841–857.
- Page, R. ja Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. Nat Chem Biol, **12**(4): 208–214.
- Pandey, D. P. ja Gerdes, K. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. Nucleic Acids Res, **33**(3): 966–976.
- Pedersen, K., Zavialov, A. V., Pavlov, M. Y., Elf, J., Gerdes, K. ja Ehrenberg, M. (2004). The Bacterial Toxin RelE Displays Codon-Specific Cleavage of mRNAs in the Ribosomal A Site. Cell, **112**(1): 131–140.
- Ramage, H. R., Connolly, L. E. ja Cox, J. S. (2009). Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: Implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. PLoS Genet, **5**(12): e1000767.
- Ren, D., Bedzyk, L. A., Thomas, S. M., Ye, R. W. ja Wood, T. K. (2004). Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. Appl Genet Mol Biotechnol, **64**: 515–524.
- Rocker, A. ja Meinhart, A. (2015). A cis-acting antitoxin domain within the chromosomal toxin-antitoxin module EzeT of *Escherichia coli* quenches toxin activity. Mol Microbiol, **97**(3): 589–604.
- Ronneau, S. ja Helaine, S. (2019). Clarifying the Link Between Toxin-Antitoxin Modules and Bacterial Persistence. J Mol Biol, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.019>.
- Ruangprasert, A., Maehigashi, T., Miles, S. J., Giridharan, N., Liu, J. X. ja Dunham, C. M. (2014). Mechanisms of Toxin Inhibition and Transcriptional Repression by *Escherichia coli* DinJ-YafQ. J Biol Chem, **289**(30): 20559–20569.
- Sala, A., Bordes, P. ja Genevaux, P. (2014). Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. Toxins (Basel), **6**(3): 1002–1020.
- Sberro, H., Leavitt, A., Kiro, R., Koh, E., Peleg, Y., Qimron, U. ja Sorek, R. (2013).

- Discovery of Functional Toxin/Antitoxin Systems in Bacteria by Shotgun Cloning. Mol Cell, **50**(1): 136–148.
- Schifano, J. M., Edifor, R., Sharp, J. D., Ouyang, M., Konkimalla, A., Husson, R. N. ja Woychik, N. A. (2013). Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site. Proc Natl Acad Sci, **110**(21): 8501–8506.
- Schifano, Jason M., Cruz, J. W., Vvedenskaya, I. O., Edifor, R., Ouyang, M., Husson, R. N., Nickels, B. E., Woychik, N. A. (2016). tRNA is a new target for cleavage by a MazF toxin. Nucleic Acids Res, **44**(3): 1256–1270.
- Schuessler, D. L., Cortes, T., Fivian-Hughes, A. S., Lougheed, K. E. A., Harvey, E., Buxton, R. S., Davis, E. O., Young, D. B. (2013). Induced ectopic expression of HigB toxin in Mycobacterium tuberculosis results in growth inhibition, reduced abundance of a subset of mRNAs and cleavage of tmRNA. Mol Microbiol, **90**(1): 195–207.
- Schumacher, M. A., Piro, K. M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K. ja Brennan, R. G. (2009). Molecular Mechanisms of HipA Mediated Multidrug Tolerance and its Neutralization by HipB. Science, **323**(5912): 396–401.
- Schureck, M. A., Maehigashi, T., Miles, S. J., Marquez, J., Ei, S., Erdman, R., Dunham, C. M. (2014). Structure of the Proteus vulgaris HigB-(HigA)₂-HigB Toxin-Antitoxin Complex. J Biol Chem, **289**(2): 1060–1070.
- Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K. ja Lewis, K. (2006). Persisters: A distinct physiological state of E. coli. BMC Microbiol, **6**: 53.
- Shan, Y., Gandt, A. B., Rowe, S. E., Deisinger, J. P., Conlon, B. P. ja Lewis, K. (2017). ATP-Dependent Persister Formation in Escherichia coli. Am Soc Microbiol, **8**: e02267-16.
- Singletary, L. A., Gibson, J. L., Tanner, E. J., Mckenzie, G. J., Lee, P. L., Gonzalez, C. ja Rosenberg, S. M. (2009). An SOS-Regulated Type 2 Toxin-Antitoxin System. J Bacteriol, **191**(24): 7456–7465.
- Skjerning, R. B., Senissar, M., Winther, K. S., Gerdes, K. ja Brodersen, D. E. (2019). The RES domain toxins of RES-Xre toxin-antitoxin modules induce cell stasis by degrading NAD⁺. Mol Microbiol, **111**(1): 221–236.
- Song, S. ja Wood, T. K. (2018). Post-segregational Killing and Phage Inhibition Are Not Mediated by Cell Death Through Toxin/Antitoxin Systems. Front Microbiol, **9**: 814.
- Soo, V. W. C. ja Wood, T. K. (2013). Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD. Sci Rep, **3**: 3186.
- Stepanyan, K., Wenseleers, T., Duéñez-Guzmán, E. A., Muratori, F., Van Den Bergh, B., Verstraeten, N., Fauvart, M., Michiels, J. (2015). Fitness trade-offs explain low levels of persister cells in the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa. Mol Ecol, **24**(7): 1572–1583.
- Sun, C., Guo, Y., Tang, K., Wen, Z., Li, B., Zeng, Z. ja Wang, X. (2017). MqsR/MqsA Toxin/Antitoxin System Regulates Persistence and Biofilm Formation in Pseudomonas putida KT2440. Front Microbiol, **8**: 840.
- Syed, M. A. ja Lévesque, C. M. (2012). Chromosomal bacterial type II toxin–antitoxin systems. Can J Microbiol, **58**(5): 553–562.
- Szekeres, S., Dauti, M., Wilde, C., Mazel, D. ja Rowe-Magnus, D. A. (2007). Chromosomal toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection. Mol Microbiol, **63**(6): 1588–1605.
- Talavera, A., Tamman, H., Ainelo, A., Konijnenberg, A., Hadži, S., Sobott, F., Garcia-Pino,

- A., Hõrak, R., Loris, R. (2019). A dual role in regulation and toxicity for the disordered N-terminus of the toxin GraT. Nat Commun, **10**: 972.
- Tamman, H. (2016). The GraTA toxin-antitoxin system of *Pseudomonas putida*: regulation and role in stress tolerance. Doktoritöö, Tartu Ülikool.
- Tamman, H., Ainelo, A., Ainsaar, K. ja Hõrak, R. (2014). A moderate toxin, grat, modulates growth rate and stress tolerance of *pseudomonas putida*. J Bacteriol, **196**(1): 157–169.
- Tamman, H., Ainelo, A., Tagel, M. ja Hõrak, R. (2016). Stability of the GraA Antitoxin Depends on Growth Phase , ATP Level , and Global Regulator MexT. J Bacteriol, **198**(5): 787–796.
- Tian, Q. B., Hayashi, T., Murata, T. ja Terawaki, Y. (1996). Gene Product Identification and Promoter Analysis of hig Locus of Plasmid Rts1. Biochem Biophys Res Commun, **225**: 679–684.
- Traxler, M. F., Summers, S. M., Nguyen, H.-T., Zacharia, V. M., Smith, J. T. ja Conway, T. (2008). The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, **68**(5): 1128–1148.
- Tripathi, A., Dewan, P. C., Siddique, S. A. ja Varadarajan, R. (2014). MazF-induced growth inhibition and persister generation in *escherichia coli*. J Biol Chem, **289**(7): 4191–4205.
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N. ja van Melderen, L. (2007). What Is the Benefit to *Escherichia coli* of Having Multiple Toxin-Antitoxin Systems in Its Genome ? J Bacteriol, **189**(17): 6101–6108.
- Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O. ja Tomaz, A. (1986). The Rate of Killing of *Escherichia coli* by β -Lactam Antibiotics Is Strictly Proportional to the Rate of Bacterial Growth. J Gen Microbiol, **132**: 1297–1304.
- Unoson, C. ja Wagner, E. G. H. (2008). A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, **70**(1): 258–270.
- Unterholzner, S. J., Poppenberger, B. ja Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems: Biology, identification, and application. Mob Genet Elements, **3**(5): e26219.
- Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E. G. H. ja Altuvia, S. (2004). The Small RNA IstR Inhibits Synthesis of an SOS-Induced Toxic Peptide. Curr Biol, **14**: 2271–2276.
- Wang, X., Kim, Y., Hong, S. H., ... Wood, T. K. (2011). Antitoxin MqsA Helps Mediate the Bacterial General Stress Response. Nat Chem Biol, **7**(6): 359–366.
- Wang, X., Lord, D. M., Cheng, H.-Y., ... Wood, T. K. (2012). A Novel Type V TA System Where mRNA for Toxin GhoT is Cleaved by Antitoxin GhoS. Nat Chem Biol, **8**(10): 855–861.
- Wang, X., Lord, D. M., Hong, S. H., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R. ja Wood, T. K. (2013). Type II Toxin/Antitoxin MqsR/MqsA Controls Type V Toxin/ Antitoxin GhoT/GhoS. Environ Microbiol, **15**(6): 1734–1744.
- Wang, X. ja Wood, T. K. (2011). Toxin-Antitoxin Systems Influence Biofilm and Persister Cell Formation and the General Stress Response. Appl Environ Microbiol, **77**(16): 5577–5583.
- Wozniak, R. A. F. ja Waldor, M. K. (2009). A Toxin–Antitoxin System Promotes the Maintenance of an Integrative Conjugative Element. PLoS Genet, **5**(3): e1000439.
- Xie, Y., Wei, Y., Shen, Y., Li, X., Zhou, H., Tai, C., Deng, Z., Ou, H. Y. (2018). TADB 2.0: An updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci. Nucleic Acids Res,

46(Database issue): D749–D753.

- Yamaguchi, Y. ja Inouye, M. (2009). mRNA Interferases, Sequence-Specific Endoribonucleases from the Toxin–Antitoxin Systems. Prog Mol Biol Transl Sci, **85**: 467–500.
- Yamaguchi, Y. ja Inouye, M. (2011). Regulation of growth and death in Escherichia coli by toxin-antitoxin systems. Nat Rev Microbiol, **9**(11): 779–790.
- Yamaguchi, Y., Park, J., Inouye, M. (2011). Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea. Annu Rev Genet, **45**: 61–79.
- Yamaguchi, Y., Park, J. H. ja Inouye, M. (2009). MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in Escherichia coli. J Biol Chem, **284**(42): 28746–28753.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K. P., Ikura, M., Qing, G. ja Inouye, M. (2003). MazF Cleaves Cellular mRNAs Specifically at ACA to Block Protein Synthesis in Escherichia coli. Mol Cell, **12**: 913–923.
- Zhu, L., Phadtare, S., Nariya, H., Ouyang, M., Husson, R. N. ja Inouye, M. (2008). The mRNA interferases, MazF-mt3 and MazF-mt7 from Mycobacterium tuberculosis target unique pentad sequences in single-stranded RNA. Mol Microbiol, **69**(3): 559–569.
- Zielenkiewicz, U. ja Ceglowski, P. (2005). The toxin-antitoxin system of the streptococcal plasmid pSM19035. J Bacteriol, **187**(17): 6094–6105.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov (17.05.2019)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Krista Rooni,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Kromosomaalsete toksiin-antitoksiin süsteemide hind bakterile *Pseudomonas putida*,

mille juhendajad on Rita Hõrak ja Sirli Rosendahl

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Krista Rooni

27.05.2019